

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

---

ANNÉE 1934

N°

**THÈSE**

**117**

**pour le**

**Doctorat en Médecine**

(Diplôme d'Etat)

PAR

**Maurice MATHIS**

*né le 12 novembre 1907, à HANOI (Tonkin)*

---

**Contribution à l'étude du Virus amaril**  
**et**  
**à la vaccination de la Fièvre jaune**

---

*Président : M. E. BRUMPT, Professeur*

---

PARIS  
IMPRIMERIE P. ET A. DAVY  
53, rue de la Procession

---

1934



**THÈSE**  
**POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE**

## PROFESSEURS

MM.

|                                                                         |                    |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Anatomie . . . . .                                                      | ROUVIERE.          |
| Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale . . . . .       | PROUST.            |
| Physiologie . . . . .                                                   | BINET.             |
| Physique médicale . . . . .                                             | STROHL.            |
| Chimie médicale . . . . .                                               | DESGREZ.           |
| Bactériologie . . . . .                                                 | N.                 |
| Parasitologie et histoire naturelle médicale . . . . .                  | BRUMPT.            |
| Pathologie et thérapeutique générales . . . . .                         | BAUDOUIN.          |
| Pathologie médicale . . . . .                                           | CLERC.             |
| Pathologie chirurgicale . . . . .                                       | CHEVASSU.          |
| Anatomie pathologique . . . . .                                         | ROUSSY.            |
| Histologie . . . . .                                                    | CHAMPY.            |
| Pharmacologie et matière médicale . . . . .                             | TIFFENEAU.         |
| Thérapeutique . . . . .                                                 | LOEPER.            |
| Hygiène et médecine préventive . . . . .                                | TANON.             |
| Médecine légale . . . . .                                               | BALTHAZARD.        |
| Histoire de la médecine et de la chirurgie . . . . .                    | LAIGNEL-LAVASTINE. |
| Pathologie expérimentale et comparée . . . . .                          | FIESSINGER.        |
| Hydrologie thérapeutique et climatologie . . . . .                      | M. VILLARET.       |
| Clinique médicale . . . . .                                             | ACHARD.            |
|                                                                         | BEZANÇON           |
|                                                                         | CARNOT             |
|                                                                         | MARCEL LABBE.      |
| Hygiène et clinique de la première enfance . . . . .                    | LE REBOI LLET.     |
| Clinique des maladies des enfants . . . . .                             | NOBECOURT.         |
| Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale . . . . . | H. CLAUDE.         |
| Clinique des maladies cutanées et syphilitiques . . . . .               | GOUGEROT.          |
| Clinique des maladies du système nerveux . . . . .                      | GUILLAIN.          |
| Clinique des maladies infectieuses . . . . .                            | LEMIERRE.          |
|                                                                         | CUNEO.             |
| Clinique chirurgicale . . . . .                                         | GOSSET.            |
|                                                                         | GREGOIRE.          |
|                                                                         | LENORMANT.         |
| Clinique ophtalmologique . . . . .                                      | TERRIEN.           |
| Clinique urologique . . . . .                                           | MARION.            |
|                                                                         | BRINDEAU.          |
| Clinique d'accouchements . . . . .                                      | COUVELAIRE.        |
|                                                                         | JEANNIN.           |
| Clinique gynécologique . . . . .                                        | J.-L. FAURE.       |
| Clinique chirurgicale infantile et orthopédie . . . . .                 | OMBREDANNE         |
| Clinique thérapeutique médicale . . . . .                               | RATHEKY.           |
| Clinique oto-rhino-laryngologique . . . . .                             | LEMATRE.           |
| Clinique thérapeutique chirurgicale . . . . .                           | P. DUVAL.          |
| Clinique propédeutique . . . . .                                        | SERGENT.           |
| Clinique de la tuberculose . . . . .                                    | L. BERNARD.        |
| Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte . . . . .                | MATHIEU.           |
|                                                                         | HOVELACQUE.        |
| Professeurs sans chaire . . . . .                                       | MULON.             |
|                                                                         | VERNE.             |

## AGRÉGÉS EN EXERCICE :

| MM.           | MM.              | MM.          | MM.             |
|---------------|------------------|--------------|-----------------|
| ALAJOUANINE   | DONZELOT         | JOANNON      | PIEDELIEVRE     |
| AUBERTIN      | ECALLE           | LABBE HENRI  | PORTES          |
| BENARD HENRI  | FEY              | LAROCHE GUY  | QUENU           |
| BROcq         | GASTINEL         | LEVEUF       | RICHT           |
| BRULE         | GATELLIER        | LEVY-VALENSI | SANNIE          |
| BUSQUET       | De GAUDART D'AL- | LIAN         | SEZARY          |
| CADENAT       | LAINES           | MONDOR       | TROISIER        |
| CATHALA       | GIROUD           | MOREAU       | VALLERY - RADOT |
| CHABROL       | HALPHEN          | MOULONGUET   | (Pasteur)       |
| CHAILLEY-BERT | HARVIER          | MOURE        | VAUDESCAL       |
| CHEVALLIER    | HAZARD           | OBERLING     | VELTER          |
| DOGNON        | HUGUENIN         | OLIVIER      | VIGNES          |

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

---

ANNÉE 1934

N°

# **THÈSE**

**pour le**

**Doctorat en Médecine**

(Diplôme d'Etat)

PAR

**Maurice MATHIS**

*né le 12 novembre 1907, à HANOI (Tonkin)*

---

**Contribution à l'étude du Virus amaril**

**et**

**à la vaccination de la Fièvre jaune**

---

*Président: M. E. BRUMPT, Professeur*

---

PARIS

IMPRIMERIE P. ET A. DAVY

53, rue de la Procession

---

1934

ANNEE 1884

# THÈSE

pour le

Doctorat en Médecine

(Thèse de Médecine)

par

MARCO MATTEI

né le 12 novembre 1854 à Montebelluna (Italie)

Contribution à l'étude du Virus anari



et la vaccination de la Fièvre jaune

IMPRIMERIE DE J. VAN NELLE

LEIDEN

1884

A la Mémoire  
DE MON GRAND-PERE MICHEL MATHIS,  
Médecin de 1<sup>re</sup> classe de la Marine,  
mort à l'âge de 38 ans, à Saint-Louis du Sénégal  
(Epidémie de Fièvre jaune de 1878).

A MON PERE, LE D<sup>r</sup> CONSTANT MATHIS,  
Médecin Général des Troupes coloniales,  
Correspondant national de l'Académie de médecine,  
Directeur de l'Institut Pasteur  
de l'Afrique occidentale française.

A MA MERE CHERIE

A MA FEMME BIEN AIMEE

A MON ONCLE, LE D<sup>r</sup> J.-L. MATHIS,  
Médecin Lieutenant-Colonel (r) des Troupes Coloniales  
Adjoint au Maire de la Ville de Toulon,

A MES SOEURS MARCELLE ET SIMONE

A M. LE PROFESSEUR E. BRUMPT,  
Professeur de parasitologie  
à la Faculté de médecine de Paris,  
*pour l'honneur qu'il me fait en acceptant la Présidence  
de cette thèse.*

A M. LE D<sup>r</sup> A.-W. SELLARDS,  
Professeur à l'Université Harvard, à Boston,  
*à qui je dois mon initiation aux recherches expérimentales  
du typhus amaril.*

---

A MES MAITRES DE LA FACULTE DES SCIENCES :  
MESSIEURS LES PROFESSEURS  
CAULLERY, BOHN, et GUILLIERMOND  
et à MADAME LE D<sup>r</sup> M. PHISALIX  
*qui ont développé en moi le goût des Sciences Naturelles.*

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR :

A M. LE D<sup>r</sup> E. ROUX,  
Directeur de l'Institut Pasteur (*in memoriam*).

A M. LE D<sup>r</sup> A. CALMETTE,  
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur (*in memoriam*).

A M. LE D<sup>r</sup> L. MARTIN,  
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur.

---

A M. LE PROFESSEUR F. MESNIL,  
*pour sa paternelle sollicitude à mon égard  
et pour les conseils éclairés qu'il n'a cessé de me prodiguer.*

---

A M. LE PROFESSEUR A. PETTIT,  
*qui a bien voulu m'accepter pendant deux ans  
dans ses laboratoires.*

---

A M. LE PROFESSEUR E. ROUBAUD,  
*qui a été pour moi un guide bienveillant  
dans l'étude des moustiques.*

---

A M. LE PROFESSEUR MARCHOUX,  
*pour l'intérêt qu'il m'a porté au cours de mes études.*



## AVANT-PROPOS

---

Au mois d'août 1931, le Professeur A.-W. SELLARDS, de l'Université Harvard, à Boston, écrivait à M. le Dr E. ROUX, Directeur de l'Institut Pasteur, pour lui demander de venir étudier chez lui, une méthode de vaccination contre la Fièvre jaune.

M. E. ROUX, avec le libéralisme qui était un trait dominant de son caractère, accéda à sa demande et M. SELLARDS arriva à Paris, le 1<sup>er</sup> septembre. Il apportait avec lui une souche de virus amaril de Singe et une souche de virus amaril adapté à la Souris blanche par Max THEILER. L'origine de ces deux souches était un virus humain, isolé chez un Syrien, à Dakar, en décembre 1927, par le savant américain. Cette souche humaine, dont sont dérivées les souches de Singe et de Souris, a été appelée par M. SELLARDS : souche française. C'est cette souche qui est actuellement utilisée dans de nombreux laboratoires, concurremment à la souche dite *Asibi* (du nom du Noir qui l'a fournie) qui a été isolée par les Membres de la Mission Rockefeller, à Lagos (Nigeria).

M. SELLARDS demanda à M. le Dr C. MATHIS, Directeur de l'Institut Pasteur de Dakar, qui se trouvait, à ce moment, à Paris, de lui apporter, comme autrefois, sa collaboration.

Les expériences de vaccination antiamarile, faites sur le *Macacus rhesus*, montrèrent que l'on pouvait sans danger procéder à des essais sur l'Homme. Mais, pour diverses raisons, il ne fut pas possible de poursuivre à Paris, ces recherches, qui étaient cependant de la plus grande importance et c'est alors que M. le Dr Ch. NICOLLE, Directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, offrit à M. SELLARDS, qui lui avait fait part de ses embarras, de venir travailler à Tunis. M. SELLARDS s'y rendit et s'adjoignit M. le Dr J. LAIGRET, qu'il avait connu au Sénégal, et avec qui, il avait déjà collaboré.

Sur ces entrefaites, le Directeur de l'Institut Pasteur de

Dakar ayant dû rejoindre son poste, s'était préoccupé de la question de la conservation, en France, du virus amaril de Singe et du virus amaril de Souris, pour parer à la perte possible des souches utilisées à Dakar.

M. E. ROUX et M. A. CALMETTE, voulurent bien m'autoriser à me charger de ce travail pour lequel il me fut recommandé la plus grande prudence. On sait que les contaminations de laboratoire par le virus amaril de Singe ont été nombreuses dans ces dernières années, puisque G.-P. BERRY et S.-F. KITCHEN ont pu, en 1931, en rassembler 35 cas. A la lumière des acquisitions récentes, il apparaît infiniment probable que A. STOKES ainsi que H. NOGUCHI et W. STRONG, morts de Fièvre jaune, à la Côte occidentale d'Afrique, en 1927 et en 1928, le premier à Lagos (Nigeria), les deux autres à Accra (Gold Coast), se sont contaminés, au cours de leurs expériences sur les *Macacus rhesus*.

A cette époque, on ignorait encore que les organes des Singes d'Asie, morts de typhus amaril expérimental étaient virulents. On avait la notion que le virus amaril était très fragile et de fait, les médecins faisaient impunément depuis toujours les autopsies des individus morts de Fièvre jaune, sans prendre la moindre précaution. On ne connaissait pas de cas de contamination réalisés dans ces conditions. Les travaux des Commissions américaine à La Havane et française au Brésil, avaient démontré l'innocuité des humeurs, des excréta et des déjections après le 4<sup>e</sup> jour de la maladie. On connaît les courageuses expériences qui ont été faites pour établir cette notion de la fragilité du virus amaril. Mais le comportement du virus n'est pas le même chez l'Homme et chez le Singe et nos connaissances sur ce sujet sont d'acquisition récente.

Le danger connu, il était facile de l'éviter, en se servant de gants de caoutchouc et en observant les mêmes précautions qui sont de règle dans l'étude de tout germe pathogène.

Nous avons donc pu, pendant plus de deux ans, entretenir nos deux souches de virus amaril, sans le moindre accident. Nous avons été aidés, au début de notre travail, par notre camarade MARTIN-CHARPENEL et M. KOLOCHINE, assistant au laboratoire de M. le Professeur A. PETTIT.

Ce sont les expériences que nous avons eu l'occasion de pratiquer pour l'entretien de nos virus que nous rapportons dans cette thèse. Nos recherches n'ont rien d'original, elles

confirment simplement les résultats publiés par d'autres travailleurs. En cours d'études médicales, nous ne pouvions approfondir le sujet et nous mettre au courant de toute l'abondante littérature parue dans ces dernières années. Nous n'avons donc pris connaissance que des Mémoires les plus importants.

Nous remercions M. le Professeur A. PETTIT qui nous a accordé l'hospitalité de ses laboratoires et qui ne nous a ménagé ni ses conseils, ni ses encouragements ; Mlle ERBER, son Chef de laboratoire, qui nous a initié à plusieurs techniques et nous a guidé maintes fois ; M. le Professeur E. ROUBAUD qui nous a accueilli dans son laboratoire d'entomologie médicale où nous avons pu mener à bien des élevages de *Stegomyia*.

M. le Dr L. MARTIN, Sous-Directeur de l'Institut Pasteur et M. le Professeur E. MARCBOUX, ont bien voulu s'intéresser à nos recherches, nous les en remercions profondément.

Enfin notre vive reconnaissance va à M. le Professeur F. MESNIL, dont les conseils éclairés et sa sollicitude à notre égard, nous ont été d'un précieux secours.

Nous ne pouvons négliger de mentionner, en terminant, que les dépenses nécessitées pour l'achat des animaux de nos expériences ont été supportées par le budget de l'Institut Pasteur de Dakar.

---

## INTRODUCTION

---

Nous ne pouvons songer à faire un historique complet de la question du virus amaril expérimental, et passer en revue tous les travaux parus depuis 1927 sur cet important sujet.

Aussi bien, ne s'agit-il pas pour nous de faire une étude bibliographique de la question, mais de rapporter simplement nos propres recherches.

Il nous suffira donc de signaler les deux Mémoires capitaux qui nous ont servi de guides : celui de A. STOKES, J.-H. BAUER et N.-P. HUDSON : « Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals », *The american Journal of tropical Medicine*, t. 8, mars 1928, pp. 103-164, avec fig. et celui de Max THEILER : « Studies on the action of yellow fever virus in mice », *Annals tropical medicine and parasitology*, 8 juillet 1930, vol. 24, pp. 249-272.

Il nous paraît juste cependant de mentionner qu'avant la parution du Mémoire de A. STOKES et de ses collaborateurs, A.-W. SELLARDS, travaillant à Dakar, en fin 1927, indépendamment d'eux et sans avoir connaissance de leurs résultats que par la seule Note du *British medical Journal* du 1<sup>er</sup> octobre 1927, annonçant la mort d'A. STOKES avec des fragments de lettres où il était question de la sensibilité des Macaques, avait pu, avec la collaboration de C. MATHIS et de J. LAIGRET, réussir à transmettre la Fièvre jaune de l'Homme au *Macacus rhesus*, par piqûres d'*Aedes ægypti*. Leur communication fut présentée à l'Académie des sciences, dans la séance du 27 février 1928 et parut dans le tome 186 des *Comptes-rendus*, p. 604.

Depuis les travaux des Missions américaines et françaises du début du siècle, l'étude expérimentale de la Fièvre jaune n'avait plus fait aucun progrès jusqu'en 1927. On était arrêté par le manque d'un animal de laboratoire sensible au virus amaril, car on ne connaissait que l'Homme susceptible de contracter la Fièvre jaune.

L'affirmation par H. NOGUCHI, que l'agent de la maladie était un germe visible : le *Leptospira icteroides*, fut acceptée sans conteste, pendant plusieurs années, tant était

grande la notoriété du savant japonais. Cependant, on finit par se décider à faire des expériences de contrôle et personne ne fut à même de retrouver le *Leptospire* dans des cas authentiques de Fièvre jaune.

Il fallait donc s'orienter dans une autre voie et la *West african yellow fever Commission* de la Fondation Rockefeller, envoyée à Lagos (Nigeria), pour y étudier la maladie, se préoccupa tout d'abord de trouver un animal réceptif. Le Dr BEEUWKES, Directeur de la Mission, se rendit à Hambourg, chez Hagenbeck, et acheta toutes espèces d'animaux, particulièrement des Singes asiatiques, des *Macacus rhesus* et des *M. sinicus*.

C'est ainsi que A. STOKES découvrit la sensibilité de ces deux espèces au virus amaril, plus marquée chez la première que chez la seconde. C'est en manipulant le virus que A. STOKES contracta très probablement la Fièvre jaune à laquelle il succomba le 19 septembre 1927.

La découverte d'A. STOKES ouvrait un champ immense d'investigations et on pouvait se livrer à l'étude de la maladie dans les laboratoires.

STOKES, BAUER et HUDSON apportaient dans ce premier Mémoire, consacré à l'étude expérimentale de la Fièvre jaune, un grand nombre de faits. Dès 1928, ils avaient pu déjà établir :

1° que la Fièvre jaune, en Afrique occidentale, pouvait être transmise avec succès au Singe : *Macacus rhesus*,

2° que la transmission de l'Homme au Singe se faisait aussi facilement que de Singe à Singe, par l'injection de sang citraté, prélevé dès le début de la maladie,

3° que la transmission de Singe à Singe pouvait se faire par l'intermédiaire d'*Aedes ægypti*,

4° que les moustiques infectés, restent infectants toute leur vie qui peut dépasser 3 mois,

5° que la piqûre d'un seul moustique infecté est suffisante pour produire une infection mortelle chez le Singe,

6° que l'évolution de la maladie et les lésions produites par le virus chez le *M. rhesus* sont semblables à celles de l'Homme,

7° que les Singes africains sont réfractaires à l'infection amarile expérimentale.

On constata, en outre, que le sérum des individus ayant eu une atteinte antérieure de Fièvre jaune protégeait le *rhesus* contre une dose mortelle de virus amaril. Cette no-

tion était précieuse pour l'étude épidémiologique de la Fièvre jaune. Elle permettait de faire un diagnostic rétrospectif de la maladie et il devenait dès lors possible de savoir si la Fièvre jaune avait sévi depuis plus ou moins longtemps et si elle était endémique dans une région donnée.

Des enquêtes furent commencées aussitôt en Afrique, sur l'endémicité et l'épidémicité du typhus amaril, en se basant sur les résultats fournis par les expériences de séro-protection (*protection tests*) en se servant du *M. rhesus*. Mais cet animal est coûteux et difficile à se procurer et malgré l'appui généreux de la Fondation Rockefeller, il n'était guère possible de dresser la carte de répartition des zones d'endémicité amarile, comme le demandaient les Membres de l'Office international d'hygiène publique.

Heureusement qu'on ne devait pas tarder à trouver un animal plus maniable et moins coûteux que le *rhesus*.

A.-W. SELLARDS, en examinant des malades au cours de l'épidémie de Fièvre jaune de 1927, à Dakar, avait eu l'attention attirée par les symptômes qui marquent le début de la maladie : céphalalgie, rachialgie, généralement intenses, délire, facies vultueux, yeux injectés qui traduisent une localisation cérébrale du virus. Max THEILER, à qui SELLARDS avait fait part de ces constatations, procéda alors à des essais d'infection de la Souris blanche, en lui inoculant, dans le crâne, le virus amaril de Singe, rapporté par SELLARDS, de Dakar.

Après un certain nombre de passages de Souris à Souris, en se servant de leur cerveau et en utilisant uniquement la voie intracrânienne, THEILER réussit à créer une souche de virus doué de propriétés particulières ; c'était un virus neurotrope que l'on pouvait classer dans le groupe des virus filtrables. Ce virus de Souris est également susceptible d'être neutralisé par le sérum de sujets guéris de Fièvre jaune, d'où la possibilité d'utiliser cet animal, à la place du *M. rhesus*, dans les expériences de séro-protection. On constata également qu'après un certain nombre de passages par la Souris, le virus de Singe perdait sa virulence pour le Singe et lui conférait une immunité solide.

Ces constatations suggérèrent à SELLARDS l'idée qu'avec le virus de Souris, il serait sans doute possible de vacciner contre la Fièvre jaune.

SELLARDS, en collaboration avec J. LAIGRET, a pu établir ;  
1° que le virus amaril de Souris, injecté au *Macacus rhesus*

*sus*, Singe excessivement sensible, le protège contre l'inoculation d'un virus mortel de Singe,

2° que le virus amaril de Souris, injecté à l'Homme, même à des doses infinitésimales, détermine l'apparition, dans son sang d'un pouvoir protecteur vis-à-vis du virus amaril normal. Ce sérum humain, comme le sérum des individus guéris de Fièvre jaune, protège les Singes contre l'inoculation, pratiquée en même temps ou quelques heures plus tard, du virus mortel pour les témoins,

3° que le virus amaril de Souris, même à des taux notablement supérieurs aux doses vaccinales, est inoffensif pour l'Homme. Il détermine le plus généralement une infection inapparente mais pouvant être mise en évidence par l'épreuve de la séro-protection.

En se basant sur ces principes, J. LAIGRET a mis au point une méthode de vaccination et dans un Mémoire publié récemment dans les *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* (août 1933, pp. 198-204) il a donné tous les détails de sa technique relative à la préparation du vaccin et à son mode d'emploi.

De leur côté, W.-A. SAWYER, S.-F. KITCHEN et W. LLOYD (1931), tout en se servant du virus amaril de Souris, pratiquent simultanément l'injection de sérum de convalescent de Fièvre jaune.

En raison de la difficulté de se procurer du sérum humain, PETTIT et STÉFANOPOULO ont proposé d'y substituer du sérum d'animal immun de Cheval ou de Singe.

Nous sommes donc actuellement en présence de deux procédés de vaccination contre la Fièvre jaune :

1° Le procédé de la séro-vaccination de SAWYER-PETTIT,

2° Le procédé de SELLARDS-LAIGRET.

Leur mise en pratique décidera de la supériorité de l'un sur l'autre de ces procédés, et on comprendra que nos modestes connaissances ne nous permettent pas de prendre parti sur leur valeur respective.

Aussi bien ce n'est pas la question de la vaccination anti-amarile que nous avons à traiter dans cette thèse que nous soumettons à l'appréciation indulgente de nos juges. Nous avons essayé de faire œuvre personnelle et nous nous sommes efforcé de conduire nos expériences selon les règles rigoureuses de la doctrine pastoriennne, espérant qu'il nous sera possible d'en poursuivre d'autres avec encore plus de méthode et plus de fruit.

## CHAPITRE I

---

### **Virus amaril entretenu sur *Macacus rhesus* « souche française »**

#### ORIGINE

Au mois de septembre 1931, le Dr A.-W. SELLARDS apporta, à l'Institut Pasteur, un virus amaril expérimental de Singe, sous forme de sang desséché.

Ce virus provenait d'un jeune Syrien qui fut atteint de Fièvre jaune légère, au cours de l'épidémie qui sévit à Dakar en 1927 (1). Cette souche qui fut apportée par SELLARDS, en Europe, a été mise à la disposition des travailleurs de Paris, de Londres, de Berlin, de Rio de Janeiro, etc... SELLARDS a demandé qu'elle fût désignée sous le nom de « souche française ». L'autre souche utilisée dans les laboratoires est connue sous le nom de « souche Asibi », du nom de l'indigène d'où elle fut isolée par la Mission américaine Rockefeller de Lagos (Nigeria).

A partir du *Macacus rhesus* n° 168, qui fut inoculé par le Dr SELLARDS, au laboratoire du Professeur PETTIT, en septembre 1931, nous avons entretenu, nous-même cette souche, jusqu'en octobre 1933, soit durant deux années consécutives.

Nous avons inoculé une quarantaine de *M. rhesus* et effectué ainsi 10 passages avec cette souche.

#### TECHNIQUE

Au début, nous avons utilisé la méthode couramment employée et consistant dans l'inoculation d'une émulsion dense de foie de singe additionné de sang citraté et d'eau physiologique dans les proportions suivantes :

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Foie, environ .....     | 5 gr.  |
| Sang citraté .....      | 3 cc.  |
| Eau physiologique ..... | 10 cc. |

Nous inoculons dans la cavité coelomique des Singes environ 4 à 5 c.c. de ce mélange.

Dès le deuxième passage, nous avons adopté une autre méthode. Lorsqu'un Singe, infecté de fièvre jaune, était sur le point de mourir, nous le sacrifions et nous prélevions le cerveau avec lequel nous faisons une émulsion dans la proportion de 5 gr. de substance cérébrale pour 10 c.c. d'eau physiologique.

Nous injectons 2 c.c. de cette émulsion dans la cavité coelomique des animaux et, en retirant l'aiguille, nous laissons sous la peau, quelques gouttes de cette émulsion.

En sacrifiant l'animal et en faisant choix du cerveau, nous avons les plus grandes chances de nous mettre à l'abri des germes d'infection secondaire qui envahissent si rapidement, après la mort, l'organisme et plus particulièrement les viscères de la cavité abdominale.

#### FIEVRE JAUNE EXPERIMENTALE DU MACACUS RHESUS

Durant les 3 à 4 premiers jours qui suivent l'inoculation, les animaux ne présentent rien de particulier. Vers le 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> jour, la température s'élève pour atteindre 40°4, 41° et plus. Cette élévation thermique n'a de valeur que si elle contraste avec les températures des jours précédents. Il faut savoir que chez les Singes la température normale est assez variable et le seul fait de les saisir peut la faire monter d'une façon appréciable. En général, on ne considérera comme fébrile qu'une température dépassant 40°5.

C'est au point culminant de la température que l'on peut sacrifier l'animal pour conserver la souche, en prélevant le foie et de préférence le cerveau.

La mort peut survenir à l'acmé de la température ou ne se produire qu'après sa chute à 38°. (Voir courbe du *M. rhesus* n° 197, figure 1).

L'animal ne mange plus, il est prostré et se tient voûté dans un coin de la cage. On observe parfois des paralysies du train postérieur. Quand on saisit l'animal, il pousse des cris plaintifs. On constate, mais très rarement un léger subictère de la face et des oreilles. Mais pour ne pas être induit en erreur dans la constatation de ce signe, il faut avoir soin de supprimer les carottes de l'alimentation des animaux.

A la nécropsie, les divers organes sont en apparence nor-

maux; à l'exception du foie qui est hypertrophié, de couleur jaune chamois et en voie de dégénérescence graisseuse marquée. Cette lésion de la glande hépatique est un signe de premier ordre, mais il peut cependant manquer, comme

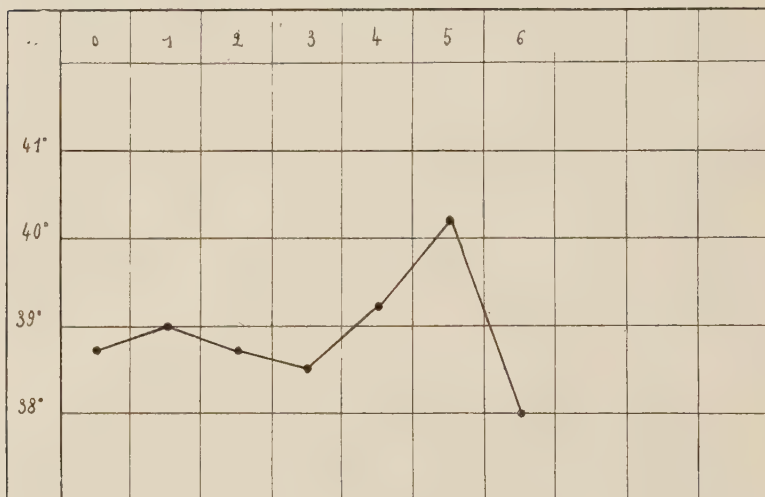


Fig. 1. — Courbe de température du « *M. rhesus* » ♀ 197, inoculée le 11 octobre 1932, sacrifiée mourant le 18 octobre 1932. Type normal.

nous l'avons constaté chez un de nos *rhesus* n° 190, dont le cerveau s'est montré virulent et avec lequel, nous avons pu infecter le *rhesus* n° 192.

Au point de vue histologique, par la coloration au Soudan III, nous avons toujours trouvé, même dans les cas atypiques macroscopiquement, de la dégénérescence accusée du foie et des reins.

#### Diagnostic.

Le diagnostic du typhus amaril expérimental chez le *M. rhesus* s'établit par un ensemble de caractères :

- 1° Le matériel inoculé a été fourni par un animal ayant succombé à une infection fébrile, avec dégénérescence graisseuse plus ou moins marquée du foie,
- 2° L'animal a présenté de la fièvre,
- 3° Le foie de couleur jaune chamois est le siège d'une dégénérescence graisseuse, appréciable macroscopiquement,

4° Les coupes du foie et des reins, obtenues par la méthode de congélation et colorées par le Soudan III, montrent des cellules envahies par la graisse,

5° Les organes, foie, cerveau, etc., conservés au frigorifique à  $-12^{\circ}$  C. conservent le pouvoir d'infecter d'autres *rhesus*.

#### CONSERVATION DU VIRUS

Les cerveaux, mis au frigorifique à  $-12^{\circ}$  C., conservent leur virulence pendant plusieurs mois.

Ainsi le *rhesus* n° 209, inoculé le 8 mars 1933 avec une émulsion de substance cérébrale du *rhesus* n° 197, mort le 18 octobre 1932 (soit depuis plus de 4 mois) a succombé 6 jours après, avec les signes du typhus amaril expérimental. Avec le cerveau du Singe n° 209, nous avons pu infecter le Singe n° 210, le 3 juillet 1933.

La conservation de la virulence des organes infectés durant plusieurs mois permet d'entretenir le virus sans faire de nombreux passages.

#### TECHNIQUE RELATIVE AU MACACUS RHESUS

Les Macaques vivent mal sous nos climats, il est donc nécessaire de les entourer de soins particuliers et de les manier avec précaution.

##### Cages.

On ne mettra dans une même cage que des animaux de même taille et de même force, pas plus de trois à quatre ensemble. Dans les cages où l'on enferme une dizaine d'animaux, les plus petits meurent de faim, malgré l'abondance de la nourriture. Les plus gros se montrent jaloux et empêchent les faibles de manger.

La température du local sera maintenue aux environs de  $20^{\circ}$  C. Avoir soin d'aérer quotidiennement la pièce où sont logés les Singes.

##### Nourriture.

Elle devra être variée et de bonne qualité. Le menu se composera de riz, de pommes de terre, cuits à l'eau, de pain, de pommes, de bananes, etc... On évitera les carottes

si les Singes doivent être infectés avec le virus amaril. Les aliments seront distribués deux fois par jour.

#### Appréciation de la santé générale.

On se rendra compte de la santé générale des individus par l'examen du pelage. Un Singe qui a une belle fourrure, lournie, soyeuse, lustrée, est en bonne santé. Par contre, tout animal dont le pelage est terne, sec, peu fourni, ne doit pas être utilisé pour des expériences de longue durée.

#### Maladies intercurrentes.

Le typhus amaril expérimental étant une infection aiguë, évoluant rapidement en 6 à 8 jours, il y a de grandes chances pour què les animaux inoculés ne succombent pas à une maladie intercurrente, si l'on a eu soin de les tenir en observation durant quelques jours avant l'expérience.

Nous avons remarqué chez certains animaux inoculés de la bouffissure des joues et de l'œdème de la face. Les paupières sont œdématiées au point qu'il y a occlusion presque complète des yeux. Le Dr SELLARDS nous a indiqué le traitement efficace de cette affection, il suffit de faire ingérer aux animaux durant plusieurs jours de suite, des œufs crus ou à peine cuits. L'œdème disparaît en très peu de temps.

Comme on le sait, il ne faut pas garder trop longtemps les Singes en captivité, car ils contractent très fréquemment la tuberculose.

#### Prise de la température.

On prendra leur température, le matin et autant que possible à la même heure. Pour saisir les animaux, il faut avoir la précaution de mettre des gants épais et en cuir, remon- tant jusqu'aux coudes. Une fois la cage entr'ouverte, on saisit très rapidement le Singe dont on désire s'emparer et on évitera qu'il se débatte trop longtemps. Les gros *Macacus rhesus*, du poids de 4 à 5 kilogr., opposent une grande résistance et ils n'hésitent pas à vous attaquer. On prendra soin de fermer les poings pour qu'ils ne saisissent pas un doigt entre leurs mâchoires. Avant de prendre la température, on laissera l'animal se reposer de cette petite lutte. Il sera maintenu par les deux bras ramenés en arrière sur le dos et par les deux membres inférieurs.

Le thermomètre sera enfoncé assez profondément dans le rectum. La température des Singes varie notablement d'un animal à l'autre, il est recommandable de prendre la tem-

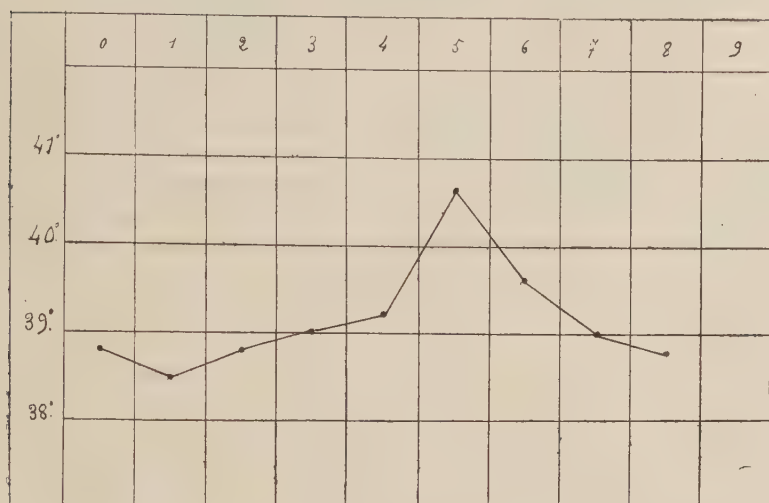


Fig. 2. — Courbe moyenne des températures de « *Macacus rhesus* » inoculés avec la « souche française » au cours de deux années d'entretien (20 sujets inoculés).

pérature quelques jours avant l'inoculation afin d'avoir une indication sur la température normale de l'animal.

#### Pesée.

Dans le typhus amaril, il n'y a pas de perte de poids appréciable, il sera cependant indiqué de peser les animaux.

#### Saignée.

La prise d'une goutte de sang à l'oreille ne demande aucune explication.

*Prise du sang en quantité notable.* — On la pratiquera par ponction de la veine saphène ou par ponction cardiaque.

a) *Ponction de la veine saphène.* — Le Singe est couché, le ventre appliqué sur une planche. Les 4 membres sont écartés et maintenus par des nœuds coulants que l'on fixe

à des trous percés dans la planche. Il ne nous paraît pas nécessaire de passer la tête dans un carcan de bois, l'animal court le risque de s'étrangler et de se blesser.

L'aide chargé de maintenir l'animal devra toujours porter des gants épais pour éviter de se faire mordre.

Avec des ciseaux, on coupe les poils de la partie postérieure de l'une des jambes, à environ trois travers de doigts au-dessous du creux poplité. En comprimant le membre au-dessus du genou la veine devient turgescence. Si on a sous les yeux deux petites veines, on cherchera un peu au-dessus la veine confluyente. A ce moment, on redresse la planche sur laquelle l'animal est fixé de façon à l'amener dans la position verticale. On lavera la région à l'alcool et on touchera à la teinture d'iode, le point où l'on introduira l'aiguille.

Les aiguilles qui conviennent le mieux doivent avoir un biseau court, très tranchant, un diamètre de 10/10 ou 12/10 millimètre et une longueur de 25 millimètres. Dès que la quantité nécessaire de sang a été prélevée (environ 2 c.c. pour une épreuve de séro-protection), on retire l'aiguille et en même temps, on abaisse la planche de manière à la ramener dans une position horizontale.

b) *Ponction cardiaque*. — Elle nécessite des aiguilles de 10 centimètres de longueur. En général, il vaut mieux ne pas y avoir recours car on risque de blesser les gros vaisseaux et d'amener la mort foudroyante de l'animal.

#### Anesthésie.

Les Macaques supportent très bien l'anesthésie à l'éther ou au chloroforme. La période d'excitation peut être violente, il faut s'y attendre pour maîtriser l'animal. Il ne faut pas oublier que l'animal se refroidit pendant l'anesthésie, il faut donc le couvrir et opérer dans une salle chauffée.

#### Inoculation intracelomique.

Un aide maintient solidement l'animal, par les deux bras ramenés en arrière et par les pattes postérieures. Il nous semble préférable de ne pas raser les poils de l'abdomen ; la peau des Singes est très fine, il s'y produit facilement des excoriations qui se contaminent très vite. Une aseptie avec l'alcool fort est suffisante. On soulève légèrement la peau du ventre et on enfonce l'aiguille dans la cavité péritonéale, et on pousse le matériel d'inoculation.

#### **Inoculation intracérébrale.**

Nous avons utilisé la méthode couramment employée dans les laboratoires de M. A. PETTIT pour l'inoculation du virus de la poliomyélite.

#### **Nécropsie.**

Elle sera conduite selon les règles habituelles et elle ne devra être pratiquée qu'avec des gants de caoutchouc, pour éviter les contaminations dangereuses. Alors que les organes d'Hommes morts de Fièvre jaune peuvent être manipulés sans danger, les organes de Singes ayant succombé au typhus amaril expérimental sont extrêmement virulents. Il a été rassemblé une trentaine de cas de contamination de laboratoire dont 7 suivis de mort.

#### **Conservation du matériel virulent.**

On prélève des fragments de foie ou de cerveau que l'on met dans des tubes stériles bouchés au coton et munis d'un capuchon de caoutchouc. Les organes sont placés dans une armoire frigorifique et conservés à une température d'environ  $-15^{\circ}$  C. La virulence persiste durant plusieurs mois. Nous n'avons jamais conservé les organes dans la glycérine.

---

## CHAPITRE II

---

### **Virus amaril adapté à la Souris blanche, « souche T. S. »**

Le virus du Singe a été adapté à la Souris blanche par MAX THEILER. Nous devons ce virus à l'obligeance du Dr SELARDS qui l'avait apporté à l'Institut Pasteur en même temps que le virus entretenu sur *M. rhesus*. Aussi l'avons-nous désigné dans nos expériences sous le nom de souche T.S.

En nous conformant à la technique de M. THEILER, nous avons conservé cette souche pendant deux ans et nous avons effectué 25 passages, du 129° au 154°.

#### **TECHNIQUE**

Nous prélevons les cerveaux, sur les Souris paralysées lorsqu'elles sont sur le point de mourir et nous les conservons à sec, dans des tubes que nous plaçons au frigorifique à — 12° et nous les y laissons au moins vingt-quatre heures avant de les utiliser. En prenant cette précaution, les germes de l'air qui auraient pu infecter les cerveaux au moment de leur prélèvement, sont détruits.

Pour faire nos passages, nous prenons toujours deux cerveaux. Nous les broyons dans un mortier le plus finement possible, durant dix minutes et nous ajoutons ensuite, progressivement, de l'eau physiologique additionnée de sérum de Lapin, dans la proportion de 1 p. 10.

En estimant que le poids d'un cerveau de Souris est de 0 gr. 50, notre émulsion à 1 p. 10 contient:

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Deux cerveaux .....     | 1 gr. |
| Sérum de Lapin .....    | 1 cc. |
| Eau physiologique ..... | 8 cc. |

Pour faire les émulsions, on utilise généralement le sérum de Lapin, mais les sérums d'autres animaux peuvent également convenir.

Avec l'émulsion à 1 p. 10, on prépare des émulsions à 1 p. 100, 1 p. 1.000, 1 p. 10.000, etc...

#### VIRULENCE DES ÉMULSIONS A DIVERS TAUX

Nous avons préparé une série de 7 émulsions de 1 p. 10 à 1 p. 10.000.000 ; avec chaque émulsion, nous avons inoculé 6 Souris. Jusqu'au taux de 1 p. 10.000, on obtient la mort des Souris dans les délais normaux et les survies sont exceptionnelles. Au taux de 1 p. 100.000, 2 Souris seulement succombent ; aux taux supérieurs, on ne constate que la mort de très rares Souris et avec un retard notable.

Tout se passe comme si nous avions affaire à des émulsions non homogènes dont les particules virulentes sont irrégulièrement réparties, de sorte qu'on peut avoir des résultats en quelque sorte paradoxaux, une émulsion très diluée amenant la mort d'une à deux Souris, alors qu'une émulsion moins diluée respecte tous les animaux.

#### TOXICITÉ DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE

Nous conservons en ampoule scellée à  $-12^{\circ}$  C. une émulsion au 1/10<sup>e</sup> en eau physiologique additionnée de 10 p. 100 de sérum de Lapin. Au bout d'un mois cette émulsion est réduite au 1/100<sup>e</sup> par addition d'eau physiologique.

Sur 6 Souris inoculées par voie intracérébrale, 2 succombent dans les délais habituels.

Nous avons alors centrifugé cette émulsion jusqu'au moment où nous avons obtenu un dépôt épais et une partie transparente.

La partie supérieure, inoculée à 6 Souris, en tue deux.

Le culot de centrifugation, inoculé à 5 Souris, en tue quatre dans les délais habituels.

Par contre, des émulsions au 1/5<sup>e</sup> en sérum de Lapin pur tue 6 Souris sur 6 après 40 jours à  $-12^{\circ}$  C.

Et après 80 jours à  $-12^{\circ}$  C. une émulsion au 1/10<sup>e</sup> en sérum de Lapin pur tue 3 Souris sur 5 dans les délais habituels.

#### INOCULATION A LA SOURIS

Nous utilisons, soit les seringues en verre de 1/4 de c.c. de capacité et graduée au 1/20<sup>e</sup> de c.c., soit des seringues,

en usage dans les services de la diphtérie, avec un curseur micrométrique sur le piston.

Les aiguilles doivent avoir un diamètre de  $6/10^{\circ}$  de millimètre et 5 millimètres de longueur, avec un biseau court.

La Souris est saisie par la queue, avec la main droite, puis posée sur le genou, tandis que la main gauche glissant le long du dos, la saisit au cou et l'immobilise, sur une plaque de liège, posée sur la table. On passe sur la tête un tampon de coton, imbibé d'alcool à  $90^{\circ}$  et l'immobilité de l'animal étant absolue, on pratique l'inoculation. On enfonce l'aiguille, à travers la peau, un peu en arrière de la ligne des yeux et légèrement sur le côté, pour éviter de léser le sinus veineux médian. Une impression tactile très particulière vous avertit qu'on a pénétré à travers les os du crâne; à ce moment, on pousse très légèrement le piston, en lisant la graduation.

La dose injectée ne doit pas dépasser le  $1/20^{\circ}$  de c.c., soit 0,05 c.c., c'est-à-dire une goutte d'une pipette débitant 20 gouttes au c.c.

Au cours de l'opération, si l'animal s'agite, l'aiguille peut glisser et atteindre les centres nerveux bulbaires; dans ce cas, la mort est instantanée. Mais avec un peu d'habitude, cet accident est facilement évité.

Après l'injection, l'animal est comme étourdi et fait des mouvements désordonnés, mais il se remet rapidement du choc opératoire et ne se ressent en rien du traumatisme et de la perforation du crâne. Malgré une antisepsie sommaire de la peau et des poils, on n'observe pour ainsi dire jamais de méningite septique. Si l'animal ne succombe pas dans les quelques instants qui suivent l'opération, il se remet rapidement et quelques heures après, il paraît tout à fait normal.

Notons que les Souris inoculées avec de l'eau physiologique, ou avec un virus neutralisé par un sérum antiamaril, restent parfaitement bien portantes et ne se ressentent en rien de l'inoculation intra-cérébrale.

On peut inoculer, en une heure, une cinquantaine de Souris.

#### FIÈVRE JAUNE EXPÉRIMENTALE DE LA SOURIS BLANCHE

Après un délai de 48 heures, si les Souris inoculées ne sont pas mortes, on peut considérer que le liquide d'injection n'était pas souillé par du Staphylocoque. Ce microbe,

injecté dans la cavité crânienne, amène rapidement la mort de l'animal.

Jusqu'au 5<sup>e</sup> jour après l'inoculation, les Souris sont en parfaite santé apparente. A partir de ce moment il se produit des changements dans l'habitus extérieur des Souris. Elles sont dans un état de prostration plus ou moins marqué, elles se mettent en boule, les poils hérissés; par instants,



Fig. 3. — Souris au cinquième jour après l'inoculation intracérébrale de virus amaril. On remarquera les deux pattes postérieures inertes.

(Photographie Jeantet I. P.)

elles se dressent brusquement sur le train postérieur; se rejettent en arrière en battant des pattes du train antérieur, comme le font certains « lapins mécaniques » d'enfants qui jouent du tambour. Puis l'animal retombe dans son état de prostration. Certains animaux présentent une vive agitation, ils tournent dans le bocal. Un peu plus tard surviennent des phénomènes d'excitation, l'animal fait des soubresauts, perd l'équilibre et tombe sur le dos. Peu de temps après, apparaissent les phénomènes de paralysie qui débutent par le train postérieur. La Souris se traîne sur le ventre, les pattes postérieures sont en extension et inertes. Cette paralysie n'est pas toujours complète, car l'animal peut contracter l'un de ses membres quand on le pince.

C'est à ce stade qu'il convient de prélever le cerveau de l'animal ; il ne faut jamais attendre la mort pour faire le prélèvement, car les microbes post-agoniques envahissent très rapidement l'organisme de la Souris. Si des Souris succombent pendant la nuit et qu'on les trouve mortes en arrivant au laboratoire, elles sont inutilisables et il n'y a plus qu'à les rejeter. C'est la raison pour laquelle on effectue les passages sur 6 Souris en moyenne, afin d'assister pour certaines d'entre elles à la phase de paralysie. Celle-ci doit être typique, si on désire prélever le cerveau.

Pour opérer le prélèvement de cet organe, on place la Souris paralysée dans un bocal avec un tampon imbibé d'éther et dès qu'elle est endormie, on la couche sur le ventre et on la maintient avec des épingles que l'on enfonce sur une plaque de liège. Les poils du dos sont imbibés d'alcool et la peau est sectionnée et rabattue au delà du museau. Avec une spatule de platine chauffée au rouge, on cautérise la boîte crânienne. Avec des ciseaux stériles, on découpe latéralement les os du crâne et on rabat la calotte d'un seul bloc. On glisse des ciseaux courbes sous la face inférieure du cerveau que l'on soulève totalement et on l'introduit dans un tube stérile tel quel. Ce tube est fermé ensuite au coton et placé au frigorifique à une température inférieure à — 10° C.

Le prélèvement du cerveau doit être fait dans les mêmes conditions qu'une intervention chirurgicale. Il va de soi que personne ne circulera autour de la table d'opération et que l'on évitera les courants d'air dans la salle. A condition de prendre ces précautions, les cerveaux prélevés ne courront pas le risque d'être contaminés.

Après le prélèvement du cerveau, on pourra compléter la nécropsie. La Souris est retournée sur le dos, on ouvre les cavités abdominale et thoracique. Mais nous devons dire que nous avons pratiqué un nombre considérable de nécropsies et nous n'avons jamais constaté d'altérations des organes visibles macroscopiquement.

Les Souris succombent généralement entre le 6<sup>e</sup> et le 11<sup>e</sup> jour. Ces 6 jours sont considérés comme étant les délais normaux. Les premières mortes peuvent se produire dès le 5<sup>e</sup> jour, parfois seulement à partir du 7<sup>e</sup> jour.

Au cours des 25 passages que nous avons pratiqués (129° au 154°), sur un total de 110 Souris qui étaient survivantes au 5<sup>e</sup> jour, 104 sont mortes dans les délais normaux, c'est-à-

dire du 6<sup>e</sup> au 11<sup>e</sup> jour, 4 au delà du 11<sup>e</sup> jour et 2 au 20<sup>e</sup> jour.

Dans une expérience (exp. n° 43), où nous avons inoculé 110 Souris, ayant servi à des recherches antérieures, et 6 Souris neuves témoins, soit un total de 116 Souris, les morts se sont échelonnées de la façon indiquée dans la figure 4.

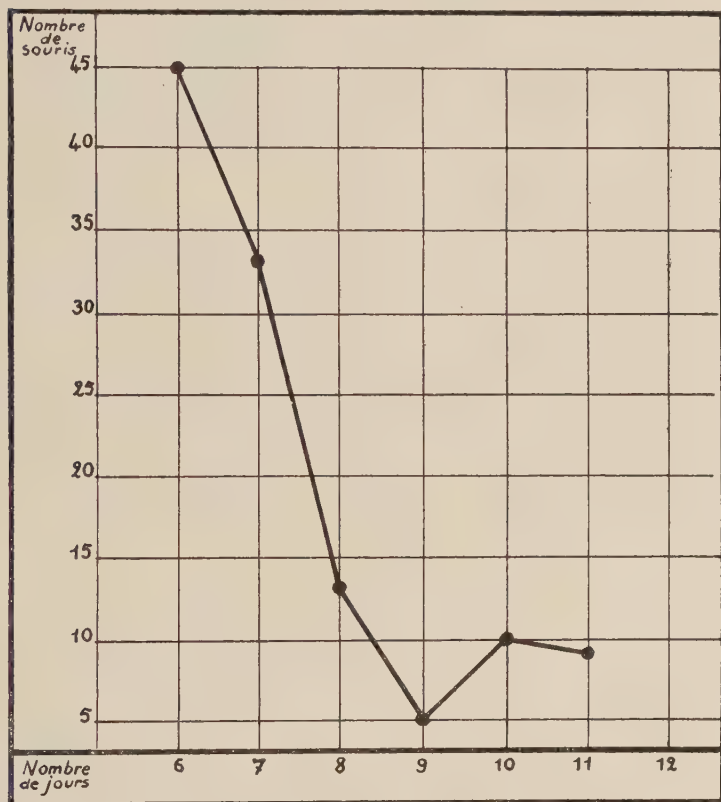


Fig. 4. — Montrant le nombre des Souris ayant succombé à une inoculation intracérébrale de virus amaril (souche T. S.). Sur 116 sujets inoculés, 45 sont morts le sixième jour.

Nous pourrions rapporter d'autres expériences identiques qui toutes nous ont fourni une proportion de mortes de 95 à 98 p. 100. Ces moyennes ont porté sur plusieurs centaines de Souris.

En général, la proportion des Souris survivantes diminue à mesure que s'accroît l'habileté manuelle de l'opérateur qui

doit choisir des aiguilles à biseau acéré. Nous pouvons affirmer que les Souris survivantes au 20<sup>e</sup> jour, mourront dans la proportion de 95 à 98 p. 100 après une réinoculation. Il est rare d'obtenir cent pour cent de morts, car on n'est jamais absolument sûr d'avoir perforé la paroi crânienne, surtout quand on inocule un grand nombre de Souris.

Avec la dose adoptée pour les passages, si une Souris survit, on peut affirmer que l'émulsion virulente n'a pas atteint le cerveau.

---

### CHAPITRE III

---

#### **Adaptation du virus amaril entretenu sur *Macacus rhesus* à la Souris blanche « souche C. 171 »**

En septembre 1931, le Professeur SELLARDS avait apporté de Boston, du sang, desséché et congelé depuis juillet, d'un Singe mort de typhus amaril expérimental.

En arrivant à l'Institut Pasteur, le Professeur SELLARDS inocula avec ce sang un *rhesus* n° 168. L'animal succomba et avec une émulsion de son foie et avec son sang, on infecta un autre *rhesus* n° 171, ♂, en excellente santé.

C'est en partant des organes de ce Singe que nous nous sommes proposé (en collaboration avec MARTIN-CHARPENEL et KOLOCHINE) d'obtenir une nouvelle souche de virus adaptée à la Souris blanche.

#### **VÉRIFICATION DE LA SOUCHE D'ORIGINE**

Il importait tout d'abord d'établir que le Singe n° 171 était bien mort de typhus amaril. L'animal avait fait de la fièvre ; sacrifié à l'agonie, on avait constaté que le foie était hypertrophié, jaune chamois ; les autres organes ne présentant aucune lésion, visible macroscopiquement. Il était donc très vraisemblable que le Singe n° 171 avait fait une Fièvre jaune expérimentale. Pour nous en assurer, nous avons inoculé 2 autres *rhesus*, n° 173 et n° 174.

1° Le *M. rhesus* n° 173 ♂ reçoit dans le cœlome 5 c.c. d'une émulsion au 1/10<sup>e</sup> de cerveau du Singe n° 171. L'animal meurt le 5<sup>e</sup> jour, après avoir présenté une courbe de température typique. A la nécropsie, les organes présentent des lésions caractéristiques du typhus amaril.

2° Le *M. rhesus* n° 174 ♂ est inoculé dans le cœlome avec 4 c.c. d'une émulsion au 1/10<sup>e</sup> de foie du *rhesus* n° 171. Il meurt

le 6<sup>e</sup> jour, après avoir présenté une courbe de température typique. A la nécropsie, les organes paraissent normaux macroscopiquement.

Dans les organes des 3 Singes, nous avons pratiqué des coupes par congélation. Après coloration au Soudan III, le foie des 3 animaux a montré une dégénérescence graisseuse très nette, avec infiltration massive du tissu hépatique. Les reins des *rhesus* n° 173 et n° 174 présentaient, en outre, de la dégénérescence graisseuse dans la majorité des tubes urinifères et des glomérules.

#### PREMIER PASSAGE SUR LA SOURIS BLANCHE

Nous broyons dans un mortier, environ 4 gr. de cerveau du *M. rhesus* n° 171, conservé à — 12° C. pendant 5 jours. L'addition à cette pulpe de 4 c.c. de sérum de Lapin normal et de 32 c.c. d'eau physiologique (8,5 gr. de NaCl par litre d'eau distillée) donne une émulsion au 1/10<sup>e</sup>. Elle est centrifugée à petite vitesse pendant 10 minutes.

Deux gouttes de la partie supérieure sont inoculées dans le cerveau de 10 Souris adultes, bien portantes et surveillées depuis quelques jours. D'autre part, l'émulsion est commencée : avant les inoculations sur des tubes de culture usuels (bouillon ordinaire, gélose inclinée, gélose de Veillon). Tous ces tubes sont demeurés stériles.

Le 9<sup>e</sup> jour après l'inoculation, les Souris ne manifestant aucun trouble apparent, l'une d'elles est sacrifiée et le cerveau est prélevé. Le 10<sup>e</sup> jour, 3 Souris malades sont sacrifiées et les cerveaux (n°s 10, 17, 18) prélevés aseptiquement sont conservés à — 12° C. pendant 29 jours.

#### PASSAGES SUIVANTS

Les résultats des premiers passages sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau I.

| Premiers passages | Nombre de souris |                                       |                                                        |                |                |                |                 |                 |                 |                 |                 |  |  |
|-------------------|------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|--|
|                   | inoculées        | vivantes<br>au<br>5 <sup>e</sup> jour | mortes ou sacrifiées mourantes<br>aux jours suivants : |                |                |                |                 |                 |                 |                 |                 |  |  |
|                   |                  |                                       |                                                        |                |                |                |                 |                 |                 |                 |                 |  |  |
|                   |                  |                                       | 6 <sup>e</sup>                                         | 7 <sup>e</sup> | 8 <sup>e</sup> | 9 <sup>e</sup> | 10 <sup>e</sup> | 11 <sup>e</sup> | 12 <sup>e</sup> | 13 <sup>e</sup> | 14 <sup>e</sup> |  |  |
| 1 <sup>er</sup>   | 10               | 10                                    | ...                                                    | ...            | ...            | S              | 3               | ...             | 1               | ...             | ...             |  |  |
| 2 <sup>e</sup>    | 13               | 13                                    | ..                                                     | 4              | ...            | ...            | 1               | ...             | ..              | SS              | ..              |  |  |
| 3 <sup>e</sup>    | 12               | 10                                    | ...                                                    | ...            | 2              | 4              | ...             | ...             | ..              | ...             | ...             |  |  |
| 4 <sup>e</sup>    | 6                | 6                                     | ...                                                    | ...            | 2              | 4              | ..              | ...             | ...             | ...             | ...             |  |  |
| 5 <sup>e</sup>    | 6                | 4                                     | ...                                                    | ...            | 2              | 2              | ...             | ...             | ...             | ...             | ...             |  |  |

S : souris sacrifiée bien portante.

C'est seulement à partir du 3<sup>e</sup> passage que les Souris présentent une période d'incubation nette, de 7 à 8 jours. Leur infection se manifeste alors, durant 24 à 48 heures, par des signes cliniques rappelant en tous points ceux observés sur les animaux infectés avec la souche de Max THEILER. Les Souris succombent, notamment, après avoir présenté des paralysies du train postérieur.

#### I. — CONTROLE PAR L'ÉPREUVE DE SÉRO-PROTECTION

Pour contrôler la nature amarile du virus que nous transmettions, nous avons cherché à le neutraliser *in vitro* par un sérum renfermant des immunisines spécifiques. Cette épreuve de séro-protection a été effectuée, selon la méthode préconisée par Max THEILER.

A cet effet 0,5 c.c. d'émulsion au 1/100<sup>e</sup> de cerveaux virulents (n<sup>os</sup> 26 et 27 du 3<sup>e</sup> passage) sont mis en contact intime, à la température du laboratoire pendant 30 minutes, avec :

- 1<sup>o</sup> 0,5 c.c. de sérum de Lapin normal ;
- 2<sup>o</sup> 0,5 c.c. de sérum antiamaril équin de PETTIT, STEFANOPOULO et FRASEY ;
- 3<sup>o</sup> 0,5 c.c. de sérum antimaril provenant du Singe 161, immunisé par A.-W. SELLARDS.

Les Souris inoculées dans le cerveau avec 2 gouttes de chacun des mélanges, succombent toutes dans le lot 1 et résistent toutes dans les lots 2 et 3, ainsi que le résume la première partie du tableau II. La seconde partie de ce tableau représente les résultats d'une épreuve de séro-protection réalisée de manière identique avec la souche de Max THEILER au 128° passage. Les résultats sont en tous points comparables : en effet, pour le virus nouvellement adapté, la période d'incubation est plus longue qu'après plusieurs passages sur la Souris.

Tableau II.

| Virus utilisé                                 | Produits inoculés      | Nombre de souris |                                    |                                                         |                |                |                |                 |                                     |
|-----------------------------------------------|------------------------|------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-------------------------------------|
|                                               |                        | inoculées        | vivantes<br>au 5 <sup>e</sup> jour | mortes ou<br>sacrifiées mourantes<br>aux jours suivants |                |                |                |                 | vivantes<br>au 20 <sup>e</sup> jour |
|                                               |                        |                  |                                    | 6 <sup>e</sup>                                          | 7 <sup>e</sup> | 8 <sup>e</sup> | 9 <sup>e</sup> | 10 <sup>e</sup> |                                     |
| Souche<br>C 171 (1)<br>3 <sup>e</sup> passage | Sérum normal . . . . . | 8                | 7                                  | ..                                                      | 1              | 4              | 2              | ..              | 0                                   |
|                                               | Sérum antiamaril PSF   | 6                | 6                                  | ..                                                      | ..             | ..             | ..             | ..              | 4                                   |
|                                               | Sérum antiamaril 161.  | 6                | 6                                  | ..                                                      | ..             | ..             | ..             | ..              | 6                                   |
| Souche<br>TS (2)<br>128 <sup>e</sup> passage  | Sérum normal . . . . . | 7                | 6                                  | 1                                                       | 3              | 1              | ..             | ..              | 1                                   |
|                                               | Sérum antiamaril PSF   | 6                | 6                                  | ..                                                      | ..             | ..             | ..             | ..              | 6                                   |
|                                               | Sérum antiamaril 161.  | 6                | 6                                  | ..                                                      | ..             | ..             | ..             | ..              | 6                                   |

(1) Souche étudiée dans la présente thèse.  
(2) Souche fixée par THEILER et apportée par SELLARDS.

Une expérience analogue, réalisée avec du virus à son 9<sup>e</sup> passage sur Souris et portant sur 40 Souris, réparties en deux lots, a confirmé les premiers résultats.

## II. — CONTRÔLE DE LA NOUVELLE SOUCHE PAR INOCULATION AU MACACUS RHESUS

Dès que nous le pûmes, nous avons authentifié la nouvelle souche (que nous avons désignée par la notation suivante : C-171, signifiant souche adaptée à partir du cerveau du *rhesus* 171) en provoquant une infection amarile expérimentale chez le *M. rhesus*.

Deux cerveaux de Souris du 8<sup>e</sup> passage (C-171, n<sup>o</sup> 46 et 47) sont broyés et émulsionnés au 1/10<sup>e</sup> dans un mélange de sérum de Lapin (2,5 c.c.) et d'eau physiologique (3 c.c.).

Les *M. rhesus* n<sup>os</sup> 182 et 183, pesant tous deux 1.600 gr. et en bonne santé, reçoivent chacun 2,5 c.c. de cette émulsion dans le cœlome et 0,5 c.c. sous la peau, en une seule inoculation opérée en deux temps.

Le *M. rhesus* n<sup>o</sup> 182 ♂, tombe malade le 3<sup>e</sup> jour après l'inoculation ; il succombe le 5<sup>e</sup> jour ayant présenté une fièvre modérée. A la nécropsie, le foie est jaune chamois, d'aspect caractéristique.

Le *M. rhesus* n<sup>o</sup> 183 ♂, est trouvé agonisant le 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation sans qu'une élévation de température ait été notée. A la nécropsie, le foie est d'aspect jaune chamois caractéristique.

Les coupes pratiquées par congélation dans le foie et les reins de ces deux *rhesus* et colorés au Soudan III décèlent une dégénérescence massive de ces organes.

Malgré cet ensemble de signes qui semble bien établir déjà la nature amarile de l'affection produite, nous avons inoculé deux nouveaux *M. rhesus* avec le matériel prélevé sur les Singes n<sup>os</sup> 182 et 183.

Le *M. rhesus* n<sup>o</sup> 186 ♂, en bonne santé, pesant 1.700 gr., reçoit dans le cœlome et sous la peau 6 c.c. d'une émulsion assez dense de cerveau du *rhesus* n<sup>o</sup> 182, en eau physiologique pure. La température s'élève à 40° C., le 3<sup>e</sup> jour et à 40°4 C. le 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation ; il est trouvé mort le 6<sup>e</sup> jour. A la nécropsie, le foie est jaunâtre, peu caractéristique macroscopiquement.

Le *M. rhesus* n<sup>o</sup> 187 ♂, en bonne santé, pesant 1.700 gr., reçoit dans le cœlome et sous la peau 5 c.c. d'une émulsion dense en eau physiologique pure de cerveau du *M. rhesus* n<sup>o</sup> 183. Le 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation, il présente une température à 40°3 C. et est trouvé mort le lendemain. A la nécropsie, les organes semblent macroscopiquement normaux.

Les coupes de foie et des reins de ces deux Singes n<sup>os</sup> 186 et 187 montrent une dégénérescence graisseuse marquée.

En même temps que les *M. rhesus* n<sup>os</sup> 186 et 187, deux lots de 6 Souris blanches sont inoculés avec chacune des émulsions de cerveau, indiquées ci-dessus, chaque animal recevant 2 gouttes dans le cerveau. Les Souris succombent

et le virus est passé sur deux lignées différentes de Souris : souches C-182 et C-183.

Tandis que, pour l'adaptation de la souche C-171, 3 passages successifs sur Souris avaient été nécessaires pour que les animaux succombent dans un délai à peu près uniforme et avec des signes cliniques caractéristiques, lors des inoculations, pour les deux présentes lignées, les résultats furent obtenus d'emblée dès le premier passage sur Souris.

### CONCLUSIONS

Nous pensons donc être en présence d'un virus amaril adapté à la Souris blanche, en raison des constatations indiquées ci-après :

1° Le virus d'origine est représenté par un cerveau virulent, prélevé sur un *rhesus* mort de typhus amaril authentifié par l'infection mortelle que l'inoculation de son cerveau a provoquée chez deux *rhesus* ;

2° L'ensemencement du même cerveau dans les milieux aérobies et anaérobies a montré qu'il était exempt de germe cultivable ;

3° Les cerveaux de Souris de notre souche conservent leur virulence plusieurs mois, dans les conditions identiques à celles qui sont nécessaires pour la conservation du virus amaril de la souche française ;

4° Les Souris inoculées présentent des signes cliniques en tous points comparables à ceux qui s'observent sur les animaux inoculés avec une souche de virus adaptée et fixée à son 133° passage, en particulier, des paralysies du train postérieur ou antérieur ;

5° Cette souche de virus est neutralisée *in vitro* par l'addition des sérums antiamarils de Cheval et de Singe ;

6° Inoculée après 8 passages sur Souris, elle provoque une infection mortelle chez le *M. rhesus*.

La nature amarile de cette infection chez ces deux Singes a été prouvée par :

- a) la courbe de température présentée par les 2 animaux;
- b) les lésions macroscopiques et microscopiques décelées dans leurs organes ;
- c) l'infection mortelle et caractérisée, provoquée chez deux nouveaux *rhesus* par inoculation des organes des deux premiers Singes.

Les passages en série de cette souche C-171 se sont effectués régulièrement avec des résultats constants, parfaitement comparables à ceux de la souche T.S.

Ainsi du 3<sup>e</sup> au 17<sup>e</sup> passage, nous avons inoculé 92 Souris, avec 85 morts dans les délais habituels et 8 survivantes. Ces Souris survivantes n'ont pas résisté à une nouvelle inoculation d'épreuve, ce qui permet de penser qu'elles n'avaient pas reçu de virus, lors de la première inoculation.

Nous avons volontairement arrêté l'entretien de cette souche, à son 17<sup>e</sup> passage, ainsi que celui des souches C. 182 et C. 183 à leur 3<sup>e</sup> passage.

#### UTILISATION DE L'ADAPTATION À LA SOURIS BLANCHE

Les conditions d'adaptation étant maintenant bien déterminées, nous pensons que cette technique pourra être utilisée couramment dans les laboratoires pour vérifier la virulence et l'authenticité des souches entretenues sur *M. rhesus*, tout en économisant les Singes, d'un prix toujours très élevé.

## CHAPITRE IV

---

### **Neutralisation *in vitro* du virus amaril de la Souris par différents sérums**

En inoculant le virus amaril de Singe, dans le cerveau de la Souris blanche, MAX THEILER (1930) a réussi à créer une souche particulière de virus amaril adapté à cet animal. Il a également montré que ce virus de Souris était neutralisé *in vitro* par le sérum d'individus convalescents de Fièvre jaune, ainsi que par le sérum de Singes ayant résisté au typhus amaril expérimental.

Cette constatation, de la plus haute importance, permettait de substituer la Souris blanche au *Macacus rhesus*, dans les épreuves de séro-protection effectuées en vue de la détermination des zones d'endémicité amarile dans les pays où sévit de temps à autre la Fièvre jaune.

Jusqu'aux travaux de M. THEILER, on se servait de *Macacus rhesus* et du virus amaril de cet animal pour savoir si dans une région donnée, la Fièvre jaune avait sévi ou était endémique en milieu indigène.

On prélevait du sang à un certain nombre d'indigènes et avec le sérum obtenu, on injectait des *Macacus* qui recevaient en même temps du virus amaril de Singe. Si les Singes survivaient, on pouvait en conclure que le sérum jouissait d'un pouvoir protecteur et que les individus qui l'avaient fourni, avaient eu antérieurement une atteinte de Fièvre jaune. Si de jeunes enfants, n'ayant jamais quitté la région, avaient un sérum protecteur, on était en droit de considérer la région comme un foyer d'endémicité amarile ; si seuls les adultes fournissaient un sérum protecteur, on

pouvait affirmer qu'il y avait eu antérieurement une épidémie amarile, mais que la Fièvre jaune n'y était pas implantée.

Par la recherche de la séro-protection, on eut la preuve indiscutable que, contrairement à l'opinion soutenue par certains médecins, les Noirs étaient sensibles au virus amaril, mais que chez eux la maladie revêtait le plus souvent des formes atténuées et frustes.

Les Macaques sont des animaux coûteux et difficiles à se procurer et il n'était pas possible en les utilisant d'étendre les investigations sur une très large échelle. Grâce à l'usage de la Souris, on a pu donner plus d'ampleur à ce genre de recherches et Durieux (1932) et Stefanopoulo (1933), ayant recueilli, en Afrique occidentale française, un nombre assez considérable de sérums, on a pu commencer à établir la carte de répartition de l'endémicité amarile dans notre grande possession africaine.

Nous-mêmes, en suivant la technique de M. THEILER, nous avons étudié le comportement des différents sérums humains et animaux que nous avons pu nous procurer.

#### TECHNIQUE DE LA NEUTRALISATION *in vitro*

Nous préparons une émulsion de virus au  $1/10^{\circ}$  de la façon indiquée plus haut. Après une heure de décantation, nous prélevons la partie supérieure de l'émulsion et nous faisons une émulsion au  $1/100^{\circ}$  :

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Emulsion au $1/10^{\circ}$ ..... | 1 c.c. |
| Sérum de Lapin .....             | 1 c.c. |
| Eau physiologique .....          | 8 c.c. |

La neutralisation *in vitro* est effectuée avec cette émulsion au  $1/100^{\circ}$ .

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Emulsion au $1/100^{\circ}$ ..... | 0,5 c.c. |
| Sérum à éprouver .....            | 0,5 c.c. |

On laisse le virus et le sérum en contact durant 3 à 4 heures à la température du laboratoire ou 24 heures à la glacière aux environs de  $0^{\circ}$  C.

Dans les conditions de température que nous venons d'indiquer, l'émulsion du virus seul au 1/100° conserve sa virulence durant environ 48 heures. L'émulsion du virus seul est destinée à être injectée à des Souris témoins.

Toute expérience de séro-protection devra comporter les éléments suivants :

I. Les sérums à éprouver mélangés au virus dans les proportions données ci-dessus : 6 Souris pour chaque sérum ;

II. L'émulsion du virus au 1/200°, avec laquelle on injectera 6 Souris ;

III. Le sérum d'un animal reconnu immunisé ou de sujet convalescent de Fièvre jaune. Ce sérum sera mélangé au virus et servira à injecter 6 Souris.

Toutes les injections se feront par la voie intracérébrale.

On ne tiendra compte que des Souris mortes dans les délais normaux (du 5° au 11° jour) et après avoir présenté des signes d'excitation et de paralysie.

## LECTURE DES RESULTATS

1° Toutes les Souris témoins ou du moins la presque totalité (certaines par suite de faute opératoire ayant pu ne pas recevoir de virus) inoculées avec l'émulsion virulente seule doivent mourir ;

2° Toutes les Souris, inoculées avec un mélange de virus et de sérum immun, doivent résister ;

3° Parmi les lots de Souris inoculées avec un mélange du sérum à éprouver et de virus, les résultats pourront être variables pour chaque lot.

a) Lots dans lesquels toutes les Souris ont résisté : le sérum protège.

b) Lots dans lesquels toutes les Souris ont succombé : le sérum ne protège pas.

c) Lots dans lesquels il y a des morts et des survies ; si les morts sont exceptionnelles, le sérum protège au moins partiellement ; si les survies sont exceptionnelles, le sérum ne protège pas. Mais on comprend que dans certains cas, il ne soit pas possible d'interpréter les résultats. Il faudra alors recommencer l'épreuve.

VIRUS: Cerveau souris - souche T.C.  
Inoculation : 8. XL, 32 Exp. 114 Boc. 1.  
Sacrifice : 13. XL, 32, 141 passage n° 34.

Date de l'inoculation : 6. XL, 32.

Expérience n° 125.

| Emulsions               | Bocaux | Animaux<br>inoculés. | Jours |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | Animaux<br>sacrifiés. | ... <sup>me</sup> Jour. |
|-------------------------|--------|----------------------|-------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------------------|-------------------------|
|                         |        |                      | 6     | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18                    | 19                      |
| Sérum 204.              | 1.     | 6.                   | 0     | 1 | 2 | 3 | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12                    | 13                      |
| Sérum 208.              | 2.     | 6.                   | -     | - | - | - | -  | -  | 4. | 1. | 1. | -  | -  | -  | -                     | -                       |
| Sérum 144.<br>immunisé. | 4.     | 6.                   | -     | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                     | -                       |
| Sérum 144.<br>immunisé. | 4.     | 6.                   | -     | - | - | - | -  | -  | 6. | -  | -  | -  | -  | -  | -                     | -                       |

Figure 5. — Modèle d'une expérience de neutralisation *in vitro*.

L'émulsion virulente au 1/1.000 a été mise en contact 4 heures à la température du laboratoire, respectivement avec les sérums des *Rhesus* 207 et 208 et le sérum immunisé du *Rhesus* 177. *Conclusion*. — Les *Rhesus* 207 et 208 dont les sérums n'ont pas neutralisé *in vitro* l'émulsion virulente, sont réceptifs au typhus amari.

#### A. SÉRUMS D'ANIMAUX NEUFS.

Nous avons expérimenté avec le sérum de divers animaux : Cheval, Bœuf, Mouton, Chien, Lapin et diverses espèces de Singes : Cynocéphales, Cercopithèques, Hamadryas, etc...

Ces divers sérums ont, du reste, été déjà étudiés par PETTIT, STEFANOPOULO et FRASEY.

Nous avons constaté qu'aucun de ces sérums ne possédait de pouvoir protecteur.

Avec les Macaques, nous avons noté que quelques-uns avaient un pouvoir neutralisant assez marqué. Ainsi le sérum de *Macacus rhesus* n° 190 a protégé 4 Souris sur 6, mais l'animal a succombé en 8 jours à une inoculation de virus amaril dans la cavité coelomique. Son foie ne présentait pas de dégénérescence graisseuse, visible macroscopiquement, mais les organes se sont montrés virulents lorsqu'ils ont été inoculés ultérieurement.

Les 16 *Macacus rhesus* que nous avons inoculé pour l'entretien du virus ont tous succombé dans les délais normaux ; mais ce nombre est trop faible pour que nous puissions avoir une opinion sur la proportion des Singes qui seraient naturellement immuns et qui, pour certains auteurs, atteindraient 10 p. 100.

#### B. SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES DE L'INSTITUT PASTEUR.

Nous avons ensuite recherché si, parmi les sérums préparés par l'Institut Pasteur, certains ne présenteraient pas des propriétés neutralisantes vis-à-vis du virus amaril.

Aucun des sérums éprouvés : anti- (diphtérique, dysentérique, méningococcique, pesteux, poliomyélitique de Singe ou de Cheval, tétanique, venimeux, gangréneux, pneumococcique, streptococcique) n'a montré de pouvoir neutralisant. Toutes les Souris inoculées avec un mélange virus-sérum sont mortes dans les délais normaux.

#### C. SÉRUMS ANTIAMARILS ANIMAUX.

##### 1°) Sérums de *Macacus rhesus* immunisés.

Le 13 septembre 1931, MM. A.-W. SELLARDS et C. MARTIN inoculent 15 *Macacus rhesus* avec la souche amarile, entretenue sur Souris, à son 126° passage. L'émulsion virulente est constituée par 3 cerveaux de Souris, broyés avec

15 c.c. d'eau physiologique, ce qui correspond approximativement à une émulsion au 1/10°. Sur 6 Souris témoins inoculées, 5 succombent dans les délais habituels. Pour abrégé, nous désignerons cette émulsion de cerveau au 126° passage par l'abréviation S.M.

MACACUS RHESUS. N° 154 ET N° 155.

Ces *rhesus* reçoivent sous la peau 0,5 c.c. de l'émulsion S.M. Ils ne présentent aucun trouble et le sang prélevé par ponction cardiaque fournit un sérum qui protège 6 Souris sur 6. Le *rhesus* n° 154 meurt par accident le 3 novembre 1931 et le *rhesus* n° 155 de diarrhée et de faiblesse le 13 novembre 1931.

MACACUS RHESUS N° 158.

Ce *rhesus* reçoit en injection intra-veineuse 0,2 c.c. de l'émulsion S.M. Durant un mois, il ne présente aucun trouble.

Le 13 octobre 1931, soit un mois plus tard, pour vérifier son immunité, il reçoit dans la cavité coelomique 2 injections : l'une de 5 c.c. de sang citraté, l'autre 5 c.c. d'une émulsion de foie provenant du *rhesus* n° 168, mort de Fièvre jaune, en même temps que le *rhesus* neuf n° 169.

Le *rhesus* n° 158 ne présente pas la moindre élévation de température appréciable durant 16 jours alors que le *rhesus* témoin succombe le 5<sup>e</sup> jour et montre à la nécropsie un foie hypertrophié, jaune chamois.

Le 1<sup>er</sup> décembre 1931, il reçoit dans la cavité intra-cranienne (selon la technique utilisée dans le laboratoire du Professeur PETTIT, pour la poliomyélite) 0,5 c.c. d'une émulsion au 1/10° du *rhesus* n° 171, mort de typhus amaril expérimental, souche française. Le Singe n° 158 ne présente pas la moindre élévation de température.

Le 28 janvier 1932, il reçoit de nouveau dans la cavité coelomique 5 c.c. de sang citraté du *rhesus* n° 169. Il reste en parfaite santé jusqu'au 11 mars 1932, où il est saigné à blanc.

Son sérum, réparti en ampoules de 0,5 c.c., a été utilisé dans une série d'expériences d'avril 1932 à octobre 1933 ; il possédait un pouvoir neutralisant très élevé.

Sur 36 Souris inoculées, une seule a succombé dans les délais habituels, toutes les autres ont été protégées au delà du 20<sup>e</sup> jour.

MACACUS RHESUS N° 161.

Ce *rhesus* reçoit dans la cavité coelomique 5 c.c. de

l'émulsion S.M. Durant un mois, il ne présenta pas le moindre trouble.

Le 13 octobre 1931, il reçoit dans la cavité coelomique les mêmes doses de virus que le *rhesus* n° 158.

Le 1<sup>er</sup> décembre, on lui inocule de la même façon 5 c.c. d'une émulsion au 1/10<sup>e</sup> du cerveau du *rhesus* n° 171 (souche française). L'animal a conservé un état général excellent et il est sacrifié en pleine santé par une saignée totale.

Son sérum utilisé en juin 1932, dans 2 expériences, a protégé 12 Souris sur 12 alors que 11 Souris témoins sur 12 ont succombé dans les délais habituels.

En résumé, pour obtenir un sérum de *rhesus* possédant un pouvoir neutralisant élevé, on peut procéder de la façon suivante :

a) Inoculer dans la cavité coelomique et sous la peau d'un *rhesus*, environ 5 c.c. d'une émulsion au 1/100<sup>e</sup> de cerveau amaril de Souris, au delà du 120<sup>e</sup> passage ;

b) Réinoculer le Singe, au bout de 15 jours à 1 mois, avec une émulsion d'organes virulents, prélevés sur des *rhesus* morts de typhus amaril expérimental ;

c) Un mois plus tard, saigner l'animal à blanc et conserver son sérum dans des ampoules scellées à la température de 0° C. environ.

Sur un total d'une centaine de Souris inoculées avec un mélange de virus de Souris et de sérum antiamaril de Singe nous avons eu une proportion de 99 o/o de Souris protégées,

2°) Sérum antiamaril équin de PETTIT, STEFANOPOULO et FRASEY.

Au début de nos expériences, n'ayant pas de sérum de *rhesus*, nous avons utilisé le sérum anti-amaril équin, préparé à l'Institut Pasteur par PETTIT, STEFANOPOULO et FRASEY.

Nous avons utilisé au cours de 10 expériences un grand nombre de Souris. Les résultats se répartissent de la façon suivante :

a) 102 Souris ont été inoculées avec le mélange de virus au 1/100<sup>e</sup> et de sérum anti-amaril équin.

b) 93 Souris ont été inoculées avec le virus seul au 1/200<sup>e</sup>.

Dans le premier cas (a) 7 Souris ont succombé dans les délais habituels ; les autres, observées plus de 15 jours, ont résisté.

Dans le deuxième cas (b), 84 Souris ont succombé dans les délais habituels ; 9 seulement ont survécu. Mais réinoculées, elles ont succombé dans les délais habituels.

Le sérum antiamaril équin est donc doué d'un pouvoir neutralisant élevé. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par PETTIT, STEFANOPOULO et FRASEY, qui ont constaté que le sérum simiesque possède un pouvoir immunisant plus élevé que le sérum équin.

#### D. SÉRUMS ANTIAMARILS HUMAINS.

Grâce à l'obligeance de M. le Dr Alberto RECCIO (de La Havane), nous avons pu effectuer des recherches de séro-protection avec les sérums de 15 sujets cubains, demeurant à Paris.

Sur les 15 sérums, 13 se sont montrés sans aucun pouvoir neutralisant, les donneurs étaient des sujets âgés de moins de 30 ans. Par contre, les 2 autres sérums provenant de donneurs âgés de 47 ans, possédaient un pouvoir neutralisant comparable à celui des *Macacus rhesus* immunisés, mais un peu plus faibles néanmoins.

On peut conclure de ces résultats, que les sujets âgés de moins de 30 ans, n'ont jamais été atteints de Fièvre jaune alors qu'il est probable que les sujets, âgés de 47 ans, ont subi, dans leur jeune âge des atteintes de la maladie, mais sous une forme légère ou inapparente, puisqu'ils ne se souviennent pas d'avoir été infectés.

Or si nous nous reportons à l'histoire épidémiologique de l'île de Cuba, nous apprenons que depuis 1900, il n'y a plus eu d'épidémie de Fièvre jaune, alors qu'avant cette date, le typhus amaril y sévissait d'une façon endémique,

Il est donc intéressant de noter :

1° qu'il y a concordance entre les résultats fournis par les recherches de laboratoire et les données épidémiologiques.

2° que les virus amarils américain et africain sont identiques, puisque le sérum des Cubains qui ont eu la Fièvre jaune neutralise un virus amaril africain.

3° que l'immunité conférée par des atteintes mêmes légères de Fièvre jaune peut persister après plus de 30 ans.

4° que l'absence d'immunité chez des sujets nés à Cuba depuis moins de 30 ans s'explique par la non existence de la maladie depuis 1900.

## CHAPITRE V

---

### Inoculation au Rat blanc et au Cobaye

Nous avons fait un certain nombre d'expériences pour savoir si le Rat blanc et le Cobaye étaient réceptifs au virus amaril.

#### A. INOCULATION AU RAT BLANC.

EXPÉRIENCE N° 1. — Le 15 octobre 1931, nous inoculons à 6 Rats blancs, âgés d'un mois seulement et de la même portée, par la voie cérébrale, 0,2 c.c. d'une émulsion au 1/1.000<sup>e</sup> de cerveau de Souris, du 125<sup>e</sup> passage de la souche T.S.

Les Souris témoins, au nombre de 6 inoculées le même jour meurent du 6<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> jour après l'inoculation.

Quant aux 6 Rats, ils restent parfaitement indemnes.

Le 26 octobre, deux des précédents Rats sont réinoculés dans le cerveau avec une émulsion au 1/100<sup>e</sup> du virus de Souris au 128<sup>e</sup> passage. Les Souris témoins succombent dans les délais habituels, les 2 Rats demeurent bien portants. L'un d'eux est sacrifié, le 28 novembre 1931 ; à la nécropsie, les organes sont tout à fait normaux.

Deux autres des 6 Rats sont également sacrifiés et à la nécropsie, on ne note rien de particulier.

Les autres Rats, gardés en observation plusieurs semaines, sont restés bien portants.

EXPÉRIENCE N° 2. — Le 26 octobre 1931, 4 Rats âgés de quarante jours reçoivent par voie intracérébrale 0,2 c.c. d'une émulsion au 1/10<sup>e</sup> de virus amaril de Souris du 128<sup>e</sup> passage.

Les 6 Souris témoins, inoculées avec une émulsion de virus au 1/100<sup>e</sup> ont toutes succombé les 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours.

Les Rats sont restés bien portants et leur croissance a été tout à fait normale.

Ainsi nous avons échoué à produire l'infection chez les jeunes Rats avec un virus ayant dépassé le 125° passage.

Nous nous sommes alors demandé si nous ne serions pas plus heureux avec un virus de Singe ayant subi un moins grand nombre de passages sur la Souris blanche, et nous avons fait deux essais avec la souche C.171 au 7° passage et au 10° passage.

EXPÉRIENCE N° 3. — Le 5 mars 1932, 7 Rats blancs de la même portée et âgés de 2 mois, reçoivent par la voie intracérébrale environ 0,2 c.c. d'une émulsion au 1/5° dans le sérum de Lapin, de 2 cerveaux de Souris, ayant succombé avec des symptômes d'encéphalite amarile (souche C.171, 7° passage).

Les 6 Souris témoins inoculées avec une émulsion du même virus au 1/100° succombent toutes les 6°, les 7° et 8° jours.

Les 7 Rats blancs ont été gardés en observation durant plus de 20 jours. Ils n'ont réagi en aucune façon.

EXPÉRIENCE N° 4. — L'émulsion en sérum de Lapin au 1/5° nous ayant paru trop concentrée, nous avons fait un autre essai avec une émulsion plus faible.

Le 12 mai 1932, 10 Rats blancs, âgés d'un mois, sont inoculés par voie intracérébrale avec 0,2 c.c. d'une émulsion au 1/2.000° de virus de Souris de la souche C.171 du 10° passage.

Les 10 Rats, observés durant plus d'un mois, n'ont présenté aucun trouble. Les 6 Souris témoins sont mortes dans les délais habituels.

EXPÉRIENCE N° 5. — Le 6 novembre 1931, nous inoculons deux Rats blancs, un mâle et une femelle adultes, dans le cerveau avec 0,2 c.c. de sang citraté du *Macacus rhesus* n° 169, mort de typhus amaril expérimental.

La femelle met bas 9 jours après l'inoculation et allaite ses petits. Observée durant plus de 20 jours ainsi que le mâle, tous deux n'ont présenté aucun symptôme morbide.

Ainsi dans les conditions où nous avons opéré, les 29 Rats blancs inoculés se sont montrés absolument réfractaires vis-à-vis du virus amaril, que celui-ci provint de la Souris ou du *rhesus*. Le fait est assez surprenant, étant donné la parenté zoologique qui existe entre les Souris et les Rats. Mais il n'est pas impossible que l'on puisse, par quelque artifice, vaincre cette résistance du Rat.

## B. INOCULATION AU COBAYE.

EXPÉRIENCE N° 1. — Le 4 novembre 1931, nous inoculons 3 Cobayes. Le Cobaye n° 1 reçoit environ 0,3 c.c. d'eau physiologique à 8,5 gr. p. 1.000. Il est observé plus de 3 mois, sans modification de sa température.

Les Cobayes n° 2 et n° 3 reçoivent environ 0,3 c.c. d'une émulsion au 1/100<sup>e</sup> de cerveau de Souris du 127<sup>e</sup> passage.

Cinq Souris témoins succombent dans les délais habituels.

Le Cobaye n° 2 meurt dans la nuit du 8<sup>e</sup> au 9<sup>e</sup> jour, après avoir présenté une légère élévation de température les 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours. A la nécropsie les organes paraissent normaux. La bile et les humeurs, examinées au microscope à fond noir, ne montrent aucun élément mobile.

Le Cobaye n° 3 semble malade le 7<sup>e</sup> jour avec une température de 39° C., puis il se remet. Le 10<sup>e</sup> jour, il a : le matin 40°, et le soir 40°1. Il est très amaigri. Les jours suivants la température revient à la normale. Le 2 décembre, l'animal est trouvé mort. A l'examen macroscopique, les organes sont normaux, le foie est légèrement hypertrophié.

Cette expérience nous a renseigné sur trois points : elle nous montre :

- 1° que l'inoculation par voie intracérébrale d'eau physiologique ne détermine chez le Cobaye adulte aucune réaction,
- 2° que l'inoculation de virus (souche T.S.) au 1/100<sup>e</sup> amène une élévation de température très légère et fugace,
- 3° que l'animal inoculé perd beaucoup de son poids.

Par la suite, nous avons cherché à préciser cette perte de poids par des pesées régulières.

EXPÉRIENCE N° 2. — Le 20 janvier 1932, deux Cobayes, le n° 50 du poids de 520 gr. et le Cobaye n° 51 pesant 420 gr., reçoivent une émulsion de cerveau de Souris au 1/100<sup>e</sup> du 131<sup>e</sup> passage :

- a) par voie coelomique 4 c.c.
- b) par voie intracérébrale 0,3 c.c.

Les 2 Cobayes ne présentent pas la moindre élévation de température.

Le Cobaye n° 50 passe successivement de 520 gr. le jour de l'inoculation à 440 gr. le 3<sup>e</sup> jour, 395 gr. le 6<sup>e</sup> jour, 410 gr. le 9<sup>e</sup> jour, puis il reprend son poids et revient à son poids primitif le 28 février 1932.

Le Cobaye n° 51 montre une courbe de poids semblable.

Il passe de 420 gr. le jour de l'inoculation à 365 gr. et 330 gr. Le 9<sup>e</sup> jour, nous le sacrifions. Malgré son amaigrissement, il est vigoureux. A la nécropsie, on constate que tous les organes sont normaux.

Une expérience de séro-protection effectuée avec son sérum ne révèle aucun pouvoir protecteur, 5 Souris sur 5 ont succombé dans les délais habituels.

Son cerveau a été prélevé aseptiquement et après avoir été broyé, a servi à faire une émulsion au 1/10<sup>e</sup> ;

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Cerveau . . . . .           | 1 gr.  |
| Sérum de Lapin . . . . .    | 1 gr.  |
| Eau physiologique . . . . . | 8 c.c. |

Cette émulsion est inoculée, le 31 janvier 1932, au Cobaye n° 52, à raison de 6 c.c. dans la cavité coelomique et 0,3 c.c. par voie intracérébrale.

Le Cobaye n° 52, pesant 630 gr., tombe à 510 gr. le 5<sup>e</sup> jour, s'y maintient 3 jours, puis reprend son poids pour arriver à 605 gr. le 26 février. La température est restée normale.

De ces deux expériences, il semble que l'on pourrait conclure que le Cobaye est réceptif au virus amaril, mais que chez lui, l'infection ne se manifeste que par une perte de poids du 5<sup>e</sup> au 8<sup>e</sup> jour, baisse pouvant atteindre le 1/5<sup>e</sup> du poids de l'animal.

Le cerveau de l'un des Cobayes inoculés, prélevé le 9<sup>e</sup> jour, a amené également une perte de poids par inoculation à un Cobaye neuf.

La communication de G. STEFANOPOULO et R. WASSERMANN, à la séance du 5 avril 1933 de la *Société de pathologie exotique*, nous a incité à faire de nouveaux essais. Ces auteurs disent en effet « que le système nerveux du Cobaye est « réceptif pour le virus de la Fièvre jaune (souche neuro-trope de Souris du 174<sup>e</sup> passage); il devient le siège d'une « myélo-encéphalite mortelle évoluant en 6 à 13 jours « (10 cas). »

EXPÉRIENCE N° 3. — Le 10 juin 1933, cinq Cobayes reçoivent par voie intra-cérébrale 0,250 c.c. d'une émulsion au 1/10<sup>e</sup> de 2 cerveaux de Souris du 145<sup>e</sup> passage. Les 5 Souris témoins succombent toutes du 5<sup>e</sup> au 8<sup>e</sup> jour.

Voici les constatations que nous avons faites sur les 5 Cobayes :

Cobaye n° 69, du poids de 545 gr. ne montre pas de température ; le 12<sup>e</sup> jour il pèse 500 gr.

Cobaye n° 70, du poids de 630 gr., meurt dans la nuit du 20 au 21 juin<sup>e</sup>; son poids est tombé à 500 gr.

Cobaye n° 71, du poids de 435 gr., meurt le 30 juin après avoir présenté des signes de paralysie du train postérieur; son poids n'est plus que de 350 gr.

Cobaye n° 72, du poids de 535 gr., l'animal est sacrifié le 19 juin, alors qu'il présente une paralysie du train postérieur ; il ne pèse que 480 gr.

Cobaye n° 73, du poids de 585 gr. est trouvé mort le 19 juin ; son poids est de 505 gr.

EXPÉRIENCE N° 4. — Le cerveau du Cobaye n° 72, prélevé le 19 juin, n'ayant pu être conservé à — 12° C., nous avons fait une nouvelle expérience en partant du cerveau de la Souris.

Le 16 octobre 1933, 4 Cobayes reçoivent par voie intracérébrale 0,2 c.c. d'une émulsion au 1/100<sup>e</sup> de cerveau de Souris du 155<sup>e</sup> passage. Les Souris témoins succombent dans les délais habituels.

Cobaye n° 74, du poids de 534 gr. perd une vingtaine de grammes, le 4<sup>e</sup> jour, puis se remet complètement.

Cobaye n° 75, pesant 445 gr., montre le 27 octobre une paralysie très marquée du train postérieur ; il ne pèse plus que 325 gr., il est sacrifié, son cerveau est prélevé, puis immergé dans la glycérine et placé au frigorifique. à — 12° C.

Cobaye n° 76, pesant 445 gr. ; le 27 octobre il a perdu une trentaine de grammes, il paraît malade. Il est sacrifié le lendemain, tous les organes sont normaux.

Cobaye n° 77, du poids de 477 gr. ; le 3<sup>e</sup> jour il a perdu 65 gr. ; le 20 octobre il est malade, le lendemain il est trouvé mort après avoir présenté un début de paralysie du train postérieur ; son poids est tombé à 400 gr. A la nécropsie, les organes sont normaux.

Dans cette série de 4 Cobayes, nous avons donc noté deux paralysies et une mort. Chez tous les animaux, il y a eu perte de poids.

EXPÉRIENCE N° 5. — Le 17 novembre 1933, les quatre Cobayes, 55 D, 56 D, 57 D, 58 D, reçoivent par voie intracérébrale 0,250 c.c. d'une émulsion au 1/100<sup>e</sup> de trois cer-

vaux de Souris (souche T.S. 155<sup>e</sup> passage). Les 5 Souris témoins succombent toutes le 5<sup>e</sup> jour avec les signes habituels d'encéphalite amarile.

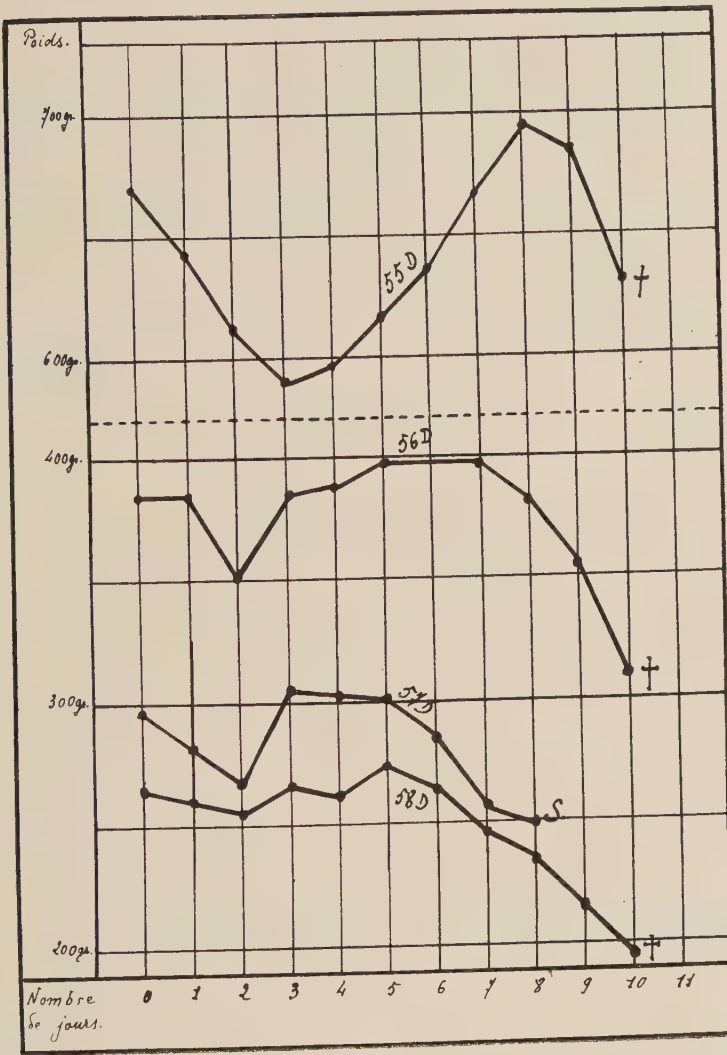


Fig. 6. — Premier passage sur Cobaye, par voie intracérébrale, du virus amaril entretenu sur Souris blanche (souche Theiler-Sellards, 154<sup>e</sup> passage).

S = sacrifié au début de la phase paralytique.  
 + = mort ou mourant.

Ayant constaté dans nos expériences précédentes des variations désordonnées de la température chez des Cobayes inoculés avec le virus amaril, nous avons porté notre attention sur les variations de poids. A cet effet, nos animaux ont été pesés tous les jours à 8 heures du matin avant la distribution de la nourriture.

A la suite du traumatisme opératoire, nos Cobayes maigrissent et présentent un minimum au 2<sup>e</sup> jour (le jour de l'inoculation étant représenté par 0). Ensuite ils reprennent un poids égal ou sensiblement supérieur à celui du jour de l'inoculation. Vers le 7<sup>e</sup> jour tous nos animaux perdent régulièrement un poids proportionnel à leur âge, les plus gros maigrissent le plus (voir figure 6).

Le 23 novembre 1933, soit au 6<sup>e</sup> jour, le Cobaye 57 D présente une paralysie du train postérieur sans perte de la sensibilité. Le 24, il est sacrifié dans la soirée. Il présente à ce moment un tremblement généralisé, une paralysie très marquée, mais avec une certaine persistance de la sensibilité.

Les trois autres Cobayes sont morts le 27 novembre, soit au 10<sup>e</sup> jour après l'inoculation, présentant des signes cliniques analogues au Cobaye 57 D. Nous devons remarquer que le Cobaye le plus gros est mort le dernier.

Cobaye 58 D, 197 gr., mort à 9 h. ; Cobaye 56 D, 310 gr., mort à 10 h. ; Cobaye 55 D, 629 gr., mort à 12 h.

A la nécropsie de tous ces animaux nous devons noter une légère dégénérescence grasseuse du foie, tous les autres organes nous paraissant normaux macroscopiquement.

Les cerveaux des quatre sujets, prélevés avec toutes les précautions nécessaires, n'ont pas montré le moindre germe visible cultivable dans le bouillon ordinaire.

Les cervaux conservés à sec à — 12° C. sont broyés avec de l'eau physiologique pure, chaque émulsion au 1/10<sup>e</sup> environ, nous sert à inoculer par la voie intracérébrale des lots de Souris.

Cobaye 55 D, 6 Souris inoculées, 3 meurent dans les délais ; Cobaye 56 D, 10 Souris inoculées, 2 meurent dans les délais ; Cobaye 57 D, 9 Souris inoculées, 6 meurent dans les délais.

Et nous constatons une Souris paralysée le 16<sup>e</sup> jour, les deux autres ayant succombé au 14<sup>e</sup> et 17<sup>e</sup> jour.

Cobaye 58 D, 7 Souris inoculées, toutes survivantes.

*Deuxième passage.* — Trois Cobayes 71 D, 72 D, 73 D

reçoivent par voie intracérébrale environ 0,250 c.c. de l'émulsion au 1/10<sup>e</sup> du cerveau 57 D. Ces trois Cobayes ont présenté un ensemble de symptômes comparables aux Cobayes du premier passage. (Voir figure 7).

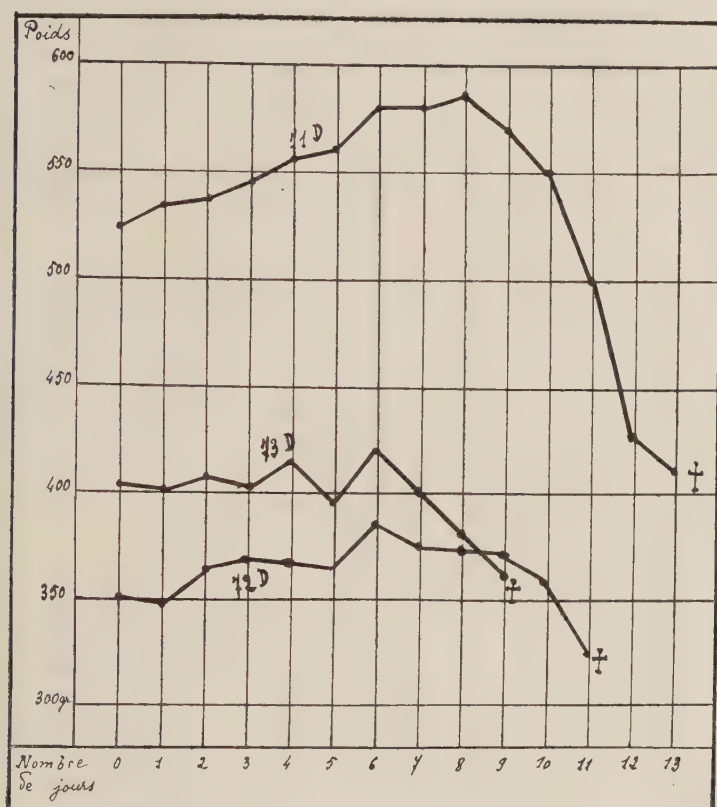


Fig. 7. — Deuxième passage sur Cobaye par voie intracérébrale.  
Le matériel virulent était constitué par une émulsion dense en eau physiologique pure du cerveau du Cobaye 57 D, conservé vingt-quatre heures depuis le prélèvement à -- 14° C.

Nous devons signaler un signe nouveau dans la symptomatologie, c'est la présence d'une sialorrhée abondante dans les heures qui précèdent l'apparition des paralysies.

Troisième passage. — Les 3 Cobayes 82 D, 83 D, 84 D inoculés avec l'émulsion dense du cerveau du Cobaye 73 D.

ont succombé dans les mêmes délais avec des signes cliniques analogues. (Voir figure 8).

Les Souris témoins inoculées pour le deuxième et troi-

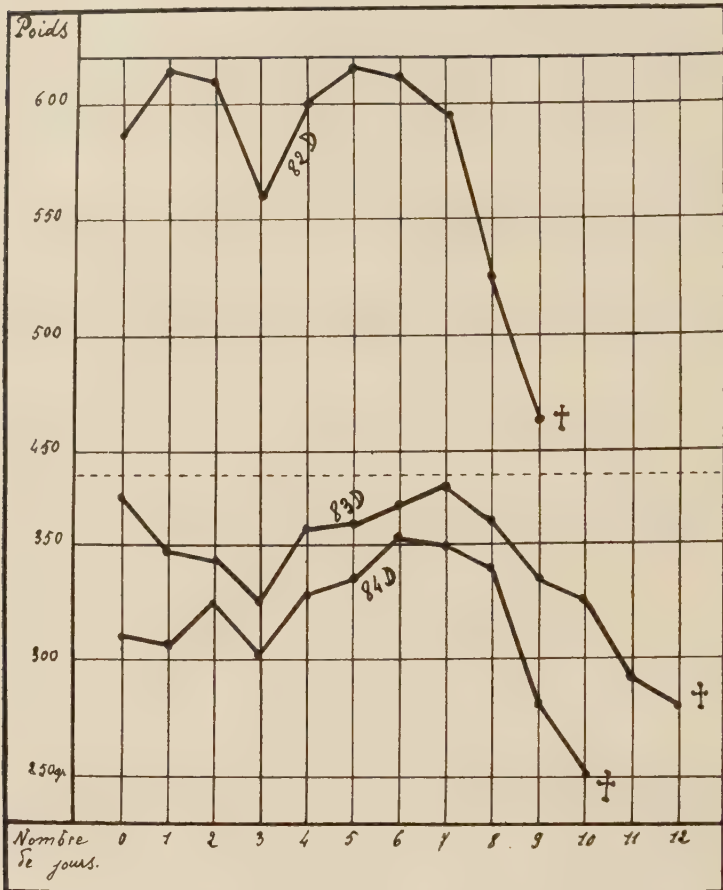


Fig. 8. — Troisième passage sur Cobaye par voie intracérébrale. Le matériel virulent était constitué par une émulsion dense en eau physiologique pure du cerveau du Cobaye 73 D, conservé vingt-quatre heures depuis le prélèvement à  $-14^{\circ}$  C.

sième passages sont mortes dans les délais habituels avec des paralysies très nettes.

En résumé, le virus de la Fièvre jaune, entretenu sur la Souris blanche, est capable de déterminer par inoculation intracérébrale chez le Cobaye, une infection aiguë, carac-

térisée par une perte de poids considérable, des paralysies du train postérieur, des paraplégies avec conservation de la sensibilité, une sialorrhée abondante et la mort entre le 9<sup>e</sup> et le 13<sup>e</sup> jour.

Le matériel virulent conservé à — 12° C., 24 heures, et inoculé par la voie intracérébrale, est capable de déterminer une infection analogue chez des sujets neufs.

---

## CHAPITRE VI

---

### Essais de vaccination antiamarile

#### I. VACCINATION DES *Macacus rhesus*.

Nous avons relaté au Chapitre IV, l'histoire de quelques *Macacus rhesus*, vaccinés par MM. SELLARDS et MATHIS, le 13 septembre 1931. Deux mois plus tard, M. SELLARDS se rendait à l'Institut Pasteur de Tunis pour entreprendre des essais de vaccination sur l'Homme en collaboration avec le Dr J. LAIGRET.

Nous avons continué, de notre côté, des expériences de vaccination sur les *Macacus rhesus*.

MACACUS RHESUS n° 177.

En décembre 1931, nous mettons en observation le *rhesus* mâle n° 177 qui était en parfaite santé et dont la température était normale.

Le 11 décembre, il reçoit dans la cavité coelomique 5 c.c. d'une émulsion au 1/100<sup>e</sup> de cerveaux de Souris, prélevés le 3 décembre (n°s 33, 34, 35, 36 du 129<sup>e</sup> passage). En même temps, nous inoculons 19 Souris, par la voie intracrânienne, pour nous assurer du pouvoir infectant du virus employé. Les Souris meurent toutes avec les signes habituels d'encéphalite du 5<sup>e</sup> au 8<sup>e</sup> jour.

Le *rhesus* est observé pendant 15 jours et sa température est prise quotidiennement. L'animal étant resté en parfaite santé est envoyé à la Singerie centrale.

Le 14 janvier 1932, ce Singe, toujours bien portant, est inoculé dans la cavité coelomique, avec le matériel virulent fourni par le *rhesus* n° 171, mort de typhus amaril expérimental (souche française).

Le matériel d'injection était composé :

a) De 3 c.c. d'une émulsion dense de foie, mélangée avec

des caillots sanguins, le tout dilué au 1/10<sup>e</sup> avec de l'eau physiologique,

b) De 3 c.c. de sérum sanguin.

La température rectale de l'animal, prise régulièrement pendant 15 jours, ne présenta aucune variation appréciable.

Le 11 mai 1932, l'animal reçoit de nouveau 4 c.c. d'une émulsion dense de foie du *rhesus* n° 173, mort de Fièvre jaune.

En même temps que le *rhesus* n° 177, deux autres *rhesus* neufs sont inoculés avec le même matériel infectant, dans les mêmes conditions ; ces deux animaux meurent de typhus amaril expérimental, les 18 et 19 mars. A la nécropsie, on constate que leur foie est hypertrophié. Les coupes histologiques obtenues par congélation et coloration au Soudan III, montrent dans le foie et dans le rein, une accumulation massive de graisse.

Le 9 avril 1932, le *rhesus* n° 177 est sacrifié, en pleine santé. A la nécropsie, tous les organes apparaissent normaux et les coupes du foie et des reins ne révèlent pas la moindre dégénérescence graisseuse.

Les expériences de neutralisation du virus ont montré que le sérum de cet animal était doué d'un fort pouvoir protecteur : il a protégé 6 Souris sur 6.

MACACUS RHESUS N° 203 ET N° 204.

Ces deux *rhesus*, dont le sérum ne possédaient aucun pouvoir protecteur, reçoivent le 8 novembre 1932, dans la cavité coelomique 4 c.c. d'une émulsion au 1/100<sup>e</sup> de cerveaux de Souris (N°s 89 et 92 du 140<sup>e</sup> passage). Les 2 animaux ne présentèrent aucune élévation de leur température.

Les Souris témoins, inoculées dans la cavité crânienne, avec la même émulsion, succombèrent dans la proportion de 6 sur 7, avec des signes de paralysie et dans les délais normaux.

Dans les heures et les jours qui suivent, les deux *rhesus* sont saignés à l'oreille et leur sang est mélangé avec du sérum de Lapin et de l'eau physiologique, dans les proportions suivantes :

|                                                  |        |
|--------------------------------------------------|--------|
| Sang du <i>Macacus rhesus</i> (n° 203 ou n° 204) | 1 c.c. |
| Sérum de Lapin .....                             | 4 c.c. |
| Eau physiologique .....                          | 2 c.c. |

Nous désignerons ces émulsions par les abréviations :  
M. 203 et M. 204.

L'émulsion M. 203, préparée avec le sang prélevé 19 heures après la vaccination, est inoculé dans la cavité crânienne de 17 Souris ; 3 succombent dans les délais normaux et une le 15<sup>e</sup> jour.

L'émulsion M. 204, obtenue dans les mêmes conditions, est inoculée de la même façon à 14 Souris ; 3 succombent le 11<sup>e</sup> et 16<sup>e</sup> jour.

L'émulsion M. 203, préparée avec du sang prélevé le 16 novembre 1932, soit 8 jours après la vaccination, est inoculée à 8 souris dont 5 succombent dans les délais normaux, avec des signes nets de paralysie d'encéphalite.

L'émulsion M. 204, obtenue dans les mêmes conditions que la précédente tue 3 Souris sur 6 dans les délais habituels.

Le 19 décembre 1932, nous préparons les émulsions M 203 et M. 204, et au lieu d'adopter la voie intra-cérébrale comme nous l'avions fait jusqu'ici, nous avons fait l'injection dans la cavité coelomique de 8 Souris. Contrairement aux résultats obtenus par divers travailleurs et qui sont presque toujours négatifs, nos 8 Souris sont mortes dans les délais normaux et nous avons pu constater chez l'un des animaux, une paralysie très nette, le 11<sup>e</sup> jour après l'inoculation.

De nos expériences sur la souris, nous nous croyons donc justifié à dire que chez les *M. rhesus* vaccinés, le virus existe dans le sang périphérique de la 19<sup>e</sup> heure au 12<sup>e</sup> jour. L'autre conclusion à tirer de nos recherches, c'est qu'aux doses où nous avons employé le virus amaril adapté à la Souris, nous n'avons déterminé chez les *M. rhesus* aucune infection apparente et pas la moindre élévation de température.

Les courbes de température de nos Singes vaccinés ne ressemblent en rien aux courbes de *M. rhesus* faisant une infection amarile.

Le *rhesus* n° 203 est mort de tuberculose pulmonaire en janvier 1933.

Le *rhesus* n° 204 est mort le 27 novembre, soit seulement 19 jours après l'inoculation de virus. A la nécropsie, rien qui pût être rapporté au typhus amaril, l'animal était amaigri considérablement. Dans les coupes du foie et des reins nous avons cependant constaté une dégénérescence graisseuse massive, nous avons alors décidé de vérifier si les organes n'étaient pas virulents.

Nous avons préparé une émulsion dense de foie que nous avons inoculée dans la cavité coelomique d'un *M. rhesus* n° 210 neuf, le 21 décembre 1931 ainsi qu'à 10 Souris. Le

Singe resta indemne, les Souris survécurent à l'exception d'une seule.

Le 3 juillet 1933, le *rhesus* n° 210 est réinoculé dans la cavité coelomique avec 1 c.c. d'une émulsion du cerveau d'un *rhesus* n° 209, ayant succombé aux atteintes d'un typhus amaril typique. Au 8<sup>e</sup> jour le *rhesus* n° 210 est mort après avoir présenté des signes cliniques de typhus amaril. Ce diagnostic a été confirmé par les constatations nécropsiques.

Il semble donc bien établi d'après ces résultats que d'une part, le virus entretenu sur la Souris blanche et adapté à cette espèce circule plusieurs jours (12 jours environ) dans le sang périphérique des Singes infectés par la voie intra-coelomique à dose massive, d'autre part que ce virus disparaît complètement et qu'il est impossible de le retrouver au delà du 20<sup>e</sup> jour. En effet les organes d'un animal au 20<sup>e</sup> jour après l'inoculation infectante sont incapables de provoquer chez plusieurs Souris (animal réactif, sensible aux émulsions virulentes au taux de 1/1.000.000<sup>e</sup>) la moindre infection et ne déterminent pas chez un *rhesus* inoculé avec des doses massives le moindre pouvoir protecteur. Et l'on sait que cet animal réagit à des doses extrêmement faibles.

## II. — ESSAIS D'INJECTION DES *Stegomyia* SUR *M. rhesus*

### VACCINÉS.

Après d'autres auteurs, nous nous sommes proposé de rechercher si *Aedes argenteus* (*-Aedes ægypti*) n'était pas susceptible de s'infecter sur les *Macacus rhesus*, au cours de leur vaccination, avec le virus de Souris.

La question est d'importance, car de sa solution dépend la généralisation de la vaccination anti-amarile aux populations africaines.

Nous avons donc commencé à réaliser des élevages d'*Aedes argenteus* au Laboratoire d'entomologie médicale de M. le Professeur Roubaud, à l'Institut Pasteur.

Nous avons reçu de l'Institut Pasteur de Dakar, par avion, sur des rondelles de liège et à sec, des œufs de *Stegomyia*. Ces œufs ont été mis dans l'eau, à une température de 20° à 25°C., ils ont éclos de 24 à 48 heures après.

En une dizaine de jours, les larves se sont transformées

en pupes et en insectes ailés. La cage d'élevage a été ensuite placée dans une étuve réglée à 28°C., les insectes sont nourris avec de l'eau sucrée imbibant un tampon de coton. Cinq jours avant de prendre leur repas de sang sur les singes vaccinés, les femelles sont soumises à un jeûne absolu.

Le 9 novembre 1932, 19 heures après l'inoculation du vaccin, le *M. rhesus* n° 203 est piqué par 20 femelles qui se précipitent sur l'animal et se gorgent de sang. Les insectes sont ensuite gardés à 28°C. Par suite de conditions particulières, ils n'ont pu faire qu'un seul repas infectant, sur les Singes vaccinés.

Ils sont transportés le 16<sup>e</sup> jour après ce repas sur le *M. resus* n° 199 et le 21<sup>e</sup> jour sur le *M. rhesus* n° 200. Les températures des animaux, prises régulièrement chaque jour ne montraient que des variations normales.

Le *rhesus* n° 200 mourut de tuberculose pulmonaire, en janvier 1933, soit près de deux mois après avoir été piqué par les Aêdes.

Le *rhesus* n° 199, resté bien portant est saigné le 17 janvier 1933, à la saphène. On constate que son sérum ne possède aucun pouvoir neutralisant, les 6 Souris inoculées avec un mélange de ce sérum et le virus ont toutes succombé, alors que 6 Souris ayant reçu le même virus, mais mélangé au sérum du *rhesus* n° 158 immunisé, ont résisté.

Le 3 juillet 1933, le *rhesus* n° 199, toujours en bonne santé, reçoit dans la cavité cœlomique 1 c.c. d'une émulsion dense de cerveau du *rhesus* n° 209, mort de typhus expérimental. L'animal présente une courbe de température typique et meurt le 8 juillet 1932 avec une température de 40°3. A la nécropsie, on constate sur le foie des zones de couleur jaune-chamois. Un autre Singe témoin, le *rhesus* n° 210, inoculé dans les mêmes conditions meurt avec des lésions typiques de typhus amaril.

Ainsi l'essai que nous avons tenté a été négatif, mais nous ne nous dissimulons pas qu'il est insuffisant pour apporter une conclusion valable. Nous aurions dû constituer plusieurs lots de moustiques que nous aurions dû faire piquer à des intervalles variés. Les conditions dans lesquelles nous avons expérimenté ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats plus valables. Nous nous proposons de reprendre ces expériences quand les circonstances nous le permettront.

III. — ESSAI D'INFECTION DE *M. rhesus* PAR INOCULATION  
DES CORPS BROYÉS D'*Aedes argenteus* AYANT PIQUÉ  
UN *rhesus* VACCINÉ.

Le 7 décembre 1932, soit un mois après leur repas infectant, 18 femelles d'*Aedes argenteus* sont encore vivantes. Nous les chloroformons, puis nous les lavons plusieurs fois avec de l'eau physiologique. Nous les broyons ensuite dans un mortier, à sec. Finalement nous faisons avec le produit de broyage une émulsion avec 10 cm<sup>3</sup> un liquide constitué par parties égales avec du sérum de Lapin et d'eau physiologique.

Deux *rhesus* n° 208 et n° 209, dont le sang ne présente aucun pouvoir protecteur vis-à-vis du virus de la Souris, reçoivent chacun dans la cavité coelomique 2 c.c. de l'émulsion précédente.

A la suite de cette inoculation, les animaux n'ont montré aucune élévation de température. Un mois plus tard, leur sérum fut éprouvé, ils ne possédaient pas le moindre pouvoir neutralisant.

En même temps que les *rhesus*, 18 Souris furent inoculées par la voie intracérébrale avec le produit de broyage des Aèdes. Toutes survécurent, à l'exception d'une seule qui mourut le 7<sup>e</sup> jour, mais sans symptômes de paralysie.

Les deux *rhesus* furent inoculés le 8 mars 1933 avec une émulsion de cerveau d'un *rhesus* n° 197 mort de typhus amaril. Les *rhesus* n° 208 et n° 209 succombèrent les 14 et 18 mars avec des symptômes de Fièvre jaune, limitées au foie. A la nécropsie le foie présente la dégénérescence graisseuse typique.

Cette expérience faite avec le produit de broyage de *Stegomyia* n'a donc donné qu'un résultat négatif, et nous n'en tirerons aucune conclusion.

---

## CONCLUSIONS

---

Plusieurs notions relatives au typhus amaril expérimental sont actuellement bien établies et nous avons pu les vérifier, en partie, par nos expériences avec le virus de Singe que nous avons eu à notre disposition.

Ce virus a pour origine un virus humain, isolé à Dakar, en 1927, par A.-W. SELLARDS, chez un Syrien atteint de Fièvre jaune légère.

Depuis cette époque, ce virus a été conservé par passages successifs sur *Macacus rhesus* et sur *Aedes egypti*. Il est connu dans les laboratoires sous le nom de « souche française », désignation donnée par A.-W. SELLARDS pour le distinguer de la « souche Asibi » (du nom du Noir qui l'a fournie) et qui a été isolée par les Membres de la Mission américaine de la Fondation Rockefeller, à Lagos (Nigeria).

En plus de ce virus amaril de Singe, nous avons étudié deux souches adaptées à la Souris blanche, dérivant de ce virus. Une souche adaptée par Max THEILER et qui nous a été remise par A.-W. SELLARDS et que nous appelons « souche T.S. » (entretenu du 125° au 156° passages) et une souche adaptée par nous même et que nous avons désigné sous le nom de « souche C.171 » (17 passages effectués) du numéro du Macaque qui nous l'a fournie.

1° L'agent pathogène de la Fièvre jaune humaine est un virus filtrant, inoculable en série au *Macacus rhesus*. Il détermine chez cet animal une infection généralisée caractérisée par de la fièvre, de la prostration, avec acmé de la température vers le 5° jour et mort entre le 5° et le 8° jour. Tous les organes sont susceptibles d'infecter un animal neuf et de reproduire la même maladie expérimentale.

2° Le virus entretenu sur *Macacus rhesus* peut être adapté par inoculation intracérébrale, à la Souris blanche. Il détermine, chez ce rongeur, une encéphalite caractérisée par une paralysie du train postérieur avec mort de l'animal

entre le 5<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour. La matière cérébrale, inoculée à des animaux neufs, provoquent la même infection. Nous sommes arrivé au 156<sup>e</sup> passage avec la souche T.S. et au 17<sup>e</sup> passage (volontairement interrompu) avec la souche C.171.

3° Le virus amaril, s'il est conservé à une température voisine de — 12° C. conserve son activité durant plusieurs mois.

4° Le virus amaril est actif à des taux extrêmement faibles. Une goutte d'une émulsion au 1/100<sup>e</sup> contient plus de mille doses mortelles.

5° Le virus amaril est neutralisé *in vitro* par le sérum des convalescents de Fièvre jaune et par le sérum des animaux guéris de typhus amaril expérimental.

Cette neutralisation est spécifique. Sa constatation permet d'affirmer 1° l'identité des virus amarils africain et américain ; 2° de porter un diagnostic rétrospectif de Fièvre jaune ; 3° de déterminer si dans une région donnée la maladie est endémique, endémo-épidémique ou seulement épidémique.

6° Le virus amaril adapté à la Souris blanche, après un certain nombre de passages par ce Rongeur, perd sa virulence primitive pour le *Macacus rhesus*. Le Singe inoculé avec ce virus fait une infection inapparente. Cette infection est décelable :

a) par la constatation de l'existence du virus dans le sang périphérique, de la 19<sup>e</sup> heure au 12<sup>e</sup> jour,

b) par les propriétés neutralisantes acquises par le sérum de l'animal inoculé.

c) par la résistance du Singe à l'injection d'une dose mortelle de virus entretenu sur *Macacus rhesus*.

Le virus adapté à la Souris blanche a donc acquis des propriétés vaccinales pour le Singe.

7° Le virus amaril adapté à la Souris blanche provoque par inoculation intracérébrale chez le Cobaye, une infection caractérisée par une perte de poids, des paraplégies, de la sialorrhée et la mort entre le 9<sup>e</sup> et le 13<sup>e</sup> jour. Cette infection peut être inoculée en série de Cobaye à Cobaye avec le matériel virulent conservé à — 12° C.

8° Le virus amaril apparaît donc comme un virus extrêmement malléable, capable de s'adapter au système nerveux de plusieurs espèces animales et de s'y maintenir avec une virulence fixe.

En résumé, l'étude de ce virus contribuera à nous faire connaître les caractères des virus filtrables et peu à peu nous dégagerons les caractères communs à tous ces virus et particuliers à chacun d'eux, ce qui nous permettra de les classer comme on le fait actuellement pour toutes les espèces animales.

En plus de ces caractères généraux, les expériences de laboratoire aboutiront sans doute dans un avenir prochain, à la prévention et peut-être à la guérison de toute cette masse énorme d'Hommes de toutes les races décimées par ce terrible fléau des zones intertropicales.

Une fois de plus le génie français se penchant sur « ses fils d'outre-mer » saura leur apporter la guérison et la santé. Le but ultime de la Science est avant tout une œuvre de charité humaine.

---

*Vu : le Président de la Thèse :*

E. BRUMPT.

*Vu : le Doyen :*

ROUSSY.

*Vu et permis d'imprimer :*

*Le Recteur de l'Académie de Paris :*

CHARLETY.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1928

STOKES (A.), BAUER (J.-H.) et HUDSON (N.-P.). — The transmission of Yellow Fever to *Macacus rhesus*. Preliminary Note. *Journ. amer. med. Assoc.*, t. 90, janvier 1928, pp. 253-254.

MATHIS (C.), SELLARDS (A.-W.) et LAIGRET (J.). — Sensibilité du *Macacus rhesus* au virus de la Fièvre jaune. *C. R. Acad. Sciences*, t. 186, 27 février 1928, p. 604.

STOKES (A.), BAUER (J.-H.) et HUDSON (N.-P.). — Experimental transmission of Yellow Fever to laboratory animals. *Amer. Journ. of trop. med.*, t. 8, mars 1928, pp. 103-164.

SELLARDS (A.-W.). — La lutte contre la fièvre jaune. *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 21, janvier 1928, pp. 70-75.

PETTIT (A.), STEFANOPOULO (G.) et FRASEY (V.). — Sérothérapie de la Fièvre jaune. XV<sup>e</sup> Congrès d'hygiène à Paris, 1928, pp. 169-174.

1929

LASNET (A.). — Relation de l'épidémie de Fièvre jaune au Sénégal en 1927. *Bull. Off. intern. hyg. publ.*, t. 21, janvier 1929, pp. 54-98.

PETTIT (A.). — Virus amaril, revue générale. *Biologie médicale*, oct. et nov. 1929, t. 19, pp. 337-389.

ROUBAUD (E.). — Recherches biologiques sur le moustique de la Fièvre jaune : *Aedes argenteus* (Poiret). *Ann. Inst. Pasteur*, t. 43, septembre 1929, pp. 1093-1209 (33 références).

1930

PETTIT (A.) et STEFANOPOULO (G.). — Fièvre jaune chez un singe du nord-africain. *C. R. Soc. Biol.*, t. 104, mai 1930, p. 63.

PETTIT (A.), ROUBAUD (E.) et STEFANOPOULO (G.). — Fièvre jaune du singe consécutive aux piqûres par *Stegomyia* de Tunisie, de Java et de Cuba. *C. R. Soc. Biol.*, t. 104, mai 1930, p. 60.

THEILER (Max). — Studies on the action of Yellow fever virus in mice. *Ann. of trop. med. a. parasit.*, t. 24, juillet 1930, pp. 249-272.

VOGEL (W. de). — Les expériences de transmission de la Fièvre jaune à l'Institut Colonial d'Amsterdam. *Bull. Off. intern. d'hyg. publ.*, t. 22, février 1930, pp. 282-286.

1931

PETTIT (A.). — Rapport sur la valeur immunisante des vaccins employés contre la Fièvre jaune et la valeur thérapeutique du sérum anti-amaril. *Bull. Acad. med.*, mars 1931, pp. 522-526.

THEILER (Max). — Neutralization tests with immune Yellow fever sera and a strain of Yellow Fever virus adapted to mice. *Ann. trop. med. a paras.*, t. 25, mars 1931, pp. 69-77.

VOGEL (W. de). — Sur l'emploi de la souris blanche pour les recherches sur la Fièvre jaune. *Bull. Off. intern. d'hyg. publ.*, juillet 1931, pp. 1210-1215.

1932

DURIEUX (C.). — Enquête sur la Fièvre jaune dans les colonies du Niger, du Soudan et du Dahomey. (Note préliminaire). *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 25, juillet 1932, pp. 834-836 et *Ann. Inst. Pasteur*, t. 49, décembre 1932, pp. 736-742. 1 carte et 2 planches hors-texte.

MATHIS (M.), MARTIN-CHARPENEL (G.) et KOLOCHINE (C.). — Adaptation du virus amaril à la souris blanche. *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 25, février et juin 1932.

SELLARDS (A.-W.) et LAIGRET (J.). — Vaccination de l'homme contre la Fièvre jaune. *C. R. Acad. Sc.*, t. 194, mai 1932, pp. 1609-1611.

— —. Contrôle par épreuve sur *Macacus rhesus* du pouvoir protecteur du sérum des hommes vaccinés contre la Fièvre jaune avec le virus de souris. *C. R. Acad. Sc.*, t. 194.

— —. Immunisation de l'homme contre la Fièvre jaune par l'inoculation de virus de souris. *Arch. Inst. Pasteur de Tunis* (1<sup>er</sup> mémoire), t. 21, décembre 1932, pp. 229-236.

STEFANOPOULO (G.). — Sur le virus amaril d'origine murine inoculé au *Macacus rhesus*. *Bull. Soc. path. exot.*, t. 25, octobre 1932, pp. 866-868.

1933

LAIGRET (J.). — Sensibilité de certaines souris sauvages au virus de la Fièvre jaune. *C. R. Acad. Sciences*, t. 146, février 1933, p. 508.

— —. La vaccination contre la Fièvre jaune. *Bull. Soc. path. exot.*, t. 26, juin 1933, pp. 806-814.

— Recherches expérimentales sur la Fièvre jaune. *Arch. Inst. Pasteur de Tunis* (2<sup>e</sup> mémoire), t. 21, avril 1933, pp. 412-430 avec 3 courbes thermiques.

— Recherches expérimentales sur la Fièvre jaune (3<sup>e</sup> mémoire). Technique pour la préparation des vaccins-virus amarils, vaccins glycé-rinés et vaccins secs. *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, t. 22, août 1933, pp. 198-204.

PETTTT (A.) et STEFANOPOULO (G.). — Utilisation du sérum anti-amaril d'origine animale pour la vaccination de l'homme. *Bull. Acad. méd.*, t. 110, juillet 1933, pp. 67-75.

ROUBAUD (E.) et STEFANOPOULO (G.). — Recherches sur la transmission par la voie stegomyienne du virus neurotropique de la Fièvre jaune. *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 26, février 1933, pp. 305-309.

STEFANOPOULO (G.). — Sur la détermination des foyers d'endémicité amarile. *Bull. Acad. med.*, t. 109, janvier 1933, pp. 26-34.

MATHIS (Maurice). — Sur le pouvoir infectant des *Macacus rhesus* vaccinés contre la Fièvre jaune. *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 26, février 1933, pp. 310-315.

STEFANOPOULO (G.) et WASSERMAN (R.). — Sensibilité du cobaye au virus neurotrope de la Fièvre jaune. *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 26, avril 1933, pp. 557-559.

THEILER (Max) — The susceptibility of guinea Pigs to the virus of Yellow Fever. *The american Journ. of trop. med.*, juillet 1933, volume XIII, n<sup>o</sup> 4.

---



## TABLE DES MATIÈRES

---

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Avant-Propos .....                                                                                                         | 11 |
| Introduction .....                                                                                                         | 14 |
| Chapitre I. — Virus amaril entretenu sur <i>Macacus rhesus</i> « souche française » .....                                  | 18 |
| Chapitre II. — Virus amaril adapté à la Souris blanche, « souche T.S. » .....                                              | 26 |
| Chapitre III. — Adaptation du virus amaril entretenu sur <i>Macacus rhesus</i> à la Souris blanche « souche C. 171 » ..... | 32 |
| Chapitre IV. — Neutralisation <i>in vitro</i> du virus amaril de la Souris par différents sérums .....                     | 40 |
| Chapitre V. — Inoculation au Rat blanc et au Cobaye .....                                                                  | 48 |
| Chapitre VI. — Essais de vaccination antiamarile .....                                                                     | 58 |
| Conclusions .....                                                                                                          | 64 |
| Bibliographie .....                                                                                                        | 67 |

---





